v. Kahlden-Gierke

# Technik der histologischen Untersuchung

8. umgearbeitete Auflage




Gustav Fischer, Jena

INSTITUTE OF NEUROLOGY



The
ROCKEFELLER
MEDICAL LIBRARY

Presented to the Library by

Royal College of Physicians of Edinburgh

5503

# VON KAHLDEN'S TECHNIK

DER

# HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG

## PATHOLOGISCH-ANATOMISCHER PRÄPARATE

VON

Dr. EDGAR GIERKE

PRIVATDOZENT AN DER UNIVERSITÄT FREIBURG, LEITER DES PATHOLOGISCH-BAKTERIOLOGISCHEN INSTITUTS AM STÄDTISCHEN KRANKENHAUSE KARLSRUHE I. B.

ACHTE UMGEARBEITETE AUFLAGE

MIT

## TECHNIK DER UNTERSUCHUNG DES NERVENSYSTEMS

VON

Dr. SPIELMEYER

PRIVATDOZENT UND ASSISTENT AN DER PSYCHIATRISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT FREIBURG I. B.




JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1909.

Alle Rechte vorbehalten.

ROCKEFELLER MEDICAL LIBRARY
INSTITUTE OF NEUROLOGY
THE NATIONAL HOSPITAL
QUEEN SQUARE, LONDON, WC1N 3BG
CLASS WZ 5F N
ACCN. NO 8508
SOURCE RCP Edinb.
DATE July 1980

Weimar. — Druck von R. Wagner Sohn.

# Vorwort.

Die vorliegende Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung pathologisch-anatomischer Präparate ist auf Anregung des Herrn Professor Ziegler entstanden. Sie ist in erster Linie dazu bestimmt, in erweiterter Form die „Technik der Histologischen Untersuchung Pathologisch-anatomischer Präparate“ zu ersetzen, welche den ersten drei Auflagen des Lehrbuches der pathologischen Anatomie von Ernst Ziegler beigegeben war, welche dann aber für die vierte und für die fünfte Auflage nicht wieder neu bearbeitet wurde. Dieselbe ist daher der vorliegenden Bearbeitung an zahlreichen Stellen zugrunde gelegt.

Dem rein praktischen Zweck, dem das Buch dienen soll, entsprechend, sind die Namen von Autoren nur insoweit angeführt, als es zur kurzen Bezeichnung bestimmter Methoden wünschenswert erschien.

Freiburg, im Oktober 1889.

**v. Kahlden.**

# Vorwort zur zweiten Auflage.

Die zweite Auflage der „Technik“ hat an zahlreichen Stellen Zusätze und Erweiterungen erfahren. Es gilt das namentlich von den Abschnitten über Darstellung der Zelleinschlüsse, über Färbung der Bakterien, der tierischen Parasiten und vor allem des Zentralnervensystems. Das Kapitel über Entkalkung ist vollständig umgearbeitet.

Freiburg, im Dezember 1891.

**v. Kahlden.**

## Vorwort zur dritten Auflage.

In der vorliegenden dritten Auflage der „Technik“ sind namentlich die Kapitel über Bakterienfärbung, über Färbung der Haut und des Zentralnervensystems mit zahlreichen Zusätzen versehen worden. Das Kapitel über die Untersuchung des Blutes ist entsprechend seiner immer mehr zunehmenden Wichtigkeit umgearbeitet und wesentlich erweitert worden.

Freiburg, im Juli 1893.

**v. Kahlden.**

## Vorwort zur vierten Auflage.

Die vierte Auflage der „Technik“ hat zahlreiche Zusätze und Erweiterungen erfahren, besonders in den Kapiteln über Härtung der Präparate, Untersuchung der Haut und der Knochen. Neu eingefügt ist, mehrfach geäußerten Wünschen entsprechend, ein kurzer Abschnitt über das Bakterienkulturverfahren, und dementsprechend sind in dem Kapitel über die Färbung der pathogenen Bakterien auch deren wichtigste Kultureigenschaften ausgegeben. Von den früheren Auflagen der „Technik“ ist eine englische, italienische und russische Übersetzung erschienen, eine französische in Vorbereitung.

Freiburg, im Juli 1895.

**v. Kahlden.**

## Vorwort zur fünften Auflage.

Die vorliegende fünfte Auflage der „Technik“ ist mit zahlreichen Zusätzen und Erweiterungen versehen worden, die trotz mancher Abkürzungen eine Zunahme des Umfangs um etwas mehr als einen Bogen bedingen.

Entsprechend den Erfahrungen der letzten beiden Jahre ist in dem Kapitel über die Härtung der Präparate die Formalinhärtung umgearbeitet und auch bei den einzelnen Organen eingehender berücksichtigt

worden. Vermehrungen haben ferner erfahren die Abschnitte über Haut, Bakterien, Protozoen, Blut, vitale Methylenblaumethode und Färbung der Ganglienzellen. Die Darstellung der Glia ist vollständig umgearbeitet. Bei dem Zentralnervensystem glaube ich außerdem durch eine schärfere Scheidung der Methoden für Färbung der Kerne, der Ganglienzellen, der Achsenzylinder, der Markscheiden und der Glia, sowie durch einen einleitenden Hinweis auf diejenigen Methoden, die bei der Bearbeitung pathologischer Fälle in erster Linie in Betracht kommen, die Übersichtlichkeit und die Brauchbarkeit erhöht zu haben.

Eine französische Übersetzung der „Technik" ist Ende des Jahres 1895 erschienen.

Freiburg, im Dezember 1897.

**v. Kahlden.**

---

# Vorwort zur sechsten Auflage.

Auch die vorliegende sechste Auflage der „Technik" hat so zahlreiche Zusätze und Erweiterungen erfahren, daß eine Zunahme des Umfangs nicht zu vermeiden war. Das Kapitel über Bakterien dürfte in seiner jetzigen Gestalt genügen, um die mündliche Unterweisung im Laboratorium so weit als nötig zu ergänzen; von den Kapiteln über Blut und Zentralnervensystem hoffe ich, daß sie auch für eingehendere Spezialarbeiten alles Wissenswerte enthalten.

Freiburg, im Juni 1900.

**v. Kahlden.**

---

# Vorwort zur siebenten Auflage.

Schon bald nach Professor v. Kahlden's Tode erhielt ich von der Verlagsbuchhandlung die Aufforderung, eine neue Auflage der „Technik" zu bearbeiten. Ich leistete um so lieber Folge, als ich durch jahrelangen Gebrauch überzeugt war, daß an dem Wesen und Aufbau des Buches keine Änderung nötig sei. Daher betreffen die Umgestaltungen des früheren Textes nur unwesentliche Punkte, in denen abweichende persönliche Erfahrungen dies nötig machten. Dagegen sind zahlreiche

Zusätze und Erweiterungen erforderlich gewesen, die teils, dank dem rastlosen Suchen nach neuen färberischen oder mikroskopischen Reaktionen, in neu veröffentlichten Methoden bestehen, teils durch zunehmende Wichtigkeit schon früher bekannter Hilfsmittel bedingt sind. Speziell seien von derartigen Zusätzen genannt: die modernen Fett-, Kalk-, Glykogenfärbungen, die vitale und supervitale Färbung, ferner neue Glia- und Achsenzylinderfärbungen. Der stetig sich erweiternden Anwendung der Gefriermikrotome mußte ebenfalls Rechnung getragen werden.

Dem Zwecke des Buches entsprechend, ein Ratgeber bei der praktischen Arbeit im Laboratorium zu sein, sind auch ferner Literaturangaben nur gelegentlich gemacht worden. Für Spezialarbeiten sei als Nachschlagewerk auf die auch die neuere Literatur enthaltende „Enzyklopädie der mikroskopischen Technik“ Berlin-Wien 1903 hingewiesen, sowie auf die „Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie“, die stetig den neuesten technischen Errungenschaften Rechnung trägt.

Freiburg, im Dezember 1903.

**Gierke.**

---

# Vorwort zur achten Auflage.

Die letzten Jahre haben eine ganze Anzahl neuer Methoden in den Dienst der histopathologischen Technik gestellt, sodaß eine Vergrößerung des Umfanges unvermeidlich war. Sie wurde auf das Unvermeidlichste beschränkt, indem veraltete Methoden und vor allem die früheren Angaben über Bakterienzüchtung fortgelassen wurden. Letztere konnten doch nicht ausführlich genug sein, um den Gebrauch von bakteriologischen Lehr- und Taschenbüchern zu ersetzen. Dagegen wurde auf übersichtliche Anordnung des Stoffes großer Wert gelegt und zu diesem Zwecke im IX. Kapitel „Färbung bosonderer Substanzen in gesunden und kranken Zellen und Geweben“ Angaben vereinigt, die früher in verschiedenen Kapiteln des speziellen Teils zerstreut waren. Wo irgend möglich, kam die persönliche Erfahrung zum Worte, um bei der Auswahl und Ausführung der allzu zahlreichen Methoden maßgebend zu sein. Dieser Gesichtspunkt war es auch, der mich bewog, Herrn Privatdozenten Dr. Spielmeyer zu bitten, die Technik der Untersuchung des Nervensystems zu übernehmen. Ich bin Herrn Dr. Spielmeyer zu großem Danke verpflichtet, daß er sich dieser Mühe unterzogen hat

und seine reiche persönliche Erfahrung auf diesem Gebiete in den Dienst des vorliegenden Buches gestellt hat.

Im XVI. Abschnitte habe ich kurz einige Regeln über die Einsendung pathologischer Präparate zusammengestellt, da immer noch leider durch unzweckmäßige Konservierung und Verpackung viel wertvolles Material zur wissenschaftlichen Bearbeitung verloren geht.

Im allgemeinen wurde auch diesmal von literarischen Angaben Abstand genommen. Nur, wenn ein genaues Eingehen auf besondere Methoden den Rahmen des Buches überschritten hätte, wurde der Publikationsort der Originalvorschrift beigefügt.

Karlsruhe, im November 1908.

**Gierke.**

# Inhaltsübersicht.


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. Kapitel. | Mikroskop und Utensilien | 1 |
| II. Kapitel. | Untersuchung frischer pathologisch-anatomischer Präparate. Reagentien | 7 |
| III. Kapitel. | Fixierung und Härtung von Präparaten | 14 |
| Anhang | Herstellung von Sammlungspräparaten in natürlichen Farben | 19 |
| IV. Kapitel. | Die Entkalkung | 20 |
| V. Kapitel. | Injektionsverfahren | 25 |
| VI. Kapitel. | Einbettungsmethoden | 28 |
| VII. Kapitel. | Anfertigung von Schnitten | 34 |
| VIII. Kapitel. | Weiterbehandlung und Färbung von mikroskopischen Schnitten | 44 |
| | 1) Allgemeines über die Färbetechnik | 45 |
| | 2) Einlegen und Konservieren der gefärbten Präparate | 47 |
| | 3) Die Kernfärbungen | 49 |
| | A. Hämatoxylinfärbungen | 49 |
| | B. Karminfärbungen | 53 |
| | C. Anilinfarben | 56 |
| | 4) Diffuse Färbungen und Doppelfärbungen | 58 |
| | 5) Durchfärbung ganzer Stücke | 61 |
| IX. Kapitel. | Färbung besonderer Substanzen in gesunden und kranken Zellen und Geweben. | |
| | A. Darstellung der Kernteilungsfiguren | 62 |
| | B. Darstellung von Protoplasmastrukturen | 65 |
| | C. Darstellung der Zellgrenzen | 67 |
| | D. Bindegewebsfasern | 67 |
| | E. Elastische Fasern | 69 |
| | F. Verhornung | 72 |
| | G. Fibrin | 74 |
| | H. Schleim | 76 |
| | I. Colloid | 77 |
| | K. Hyalin | 77 |
| | L. Amyloid | 77 |
| | M. Fettsubstanzen | 80 |
| | I. Neutralfette | 80 |
| | II. Myelinsubstanzen | 84 |
| | III. Fettsäuren und ihre Salze | 84 |
| | N. Cholesterin | 85 |
| | O. Glykogen | 85 |

Seite

P. Kalk . . . . . 88
Q. Pigmente . . . . . 89
I. Hämoglobinogene Pigmente . . . . . 89
II. Autochthone . . . . . 92
III. Exogene . . . . . 93
IV. Entpigmentierung . . . . . 94

X. Kapitel. Untersuchung einiger pathologischer Prozesse.
A. Nekrose . . . . . 94
B. Einfache Atrophie und Pigmentatrophie . . . . 95
C. Trübe Schwellung . . . . . 95
D. Degenerationen . . . . . 95
E. Wuchernde und entzündete Gewebe . . . . . 96

XI. Kapitel. Untersuchung von Bakterien.
A. Untersuchung der ungefärbten Bakterien auf dem Objektträger . . . . . 98
B. Untersuchung im hängenden Tropfen . . . . . 98
C. Vitale Bakterienfärbung . . . . . 99
D. Untersuchung von Deckglastrockenpräparaten . . 99
E. Darstellung der Geißeln und Wimperhaare . . . 104
F. Sporenfärbung . . . . . 106
G. Darstellung der Gallerthüllen und Bakterienkapseln 108
H. Bakterienfärbung in Schnittpräparaten . . . . . 109
I. Übersicht über die Färbung der verschiedenen pathogenen Bakterien . . . . . 114
I. Kokken . . . . . 114
II. Bazillen . . . . . 116
III. Vibrionen . . . . . 130
IV. Spirillen und Spirochaeten . . . . . 130

XII. Kapitel. Untersuchung von Schimmel- und Sproßpilzen . . . . 134

XIII. Kapitel. Untersuchung tierischer Parasiten.
I. Vermes und Arthrozoen . . . . . 136
II. Protozoen . . . . . 138
Amoeben . . . . . 138
Trypanosomen . . . . . 139
Malariaplasmodien . . . . . 139
Coccidien . . . . . 141
Sarkosporidien . . . . . 141
Ciliaten . . . . . 141
Anhang: Vaccinekörperchen . . . . . 141
Negri'sche Körperchen . . . . . 141

XIV. Kapitel. Übersicht über die Behandlung der einzelnen Gewebe und Organe zum Zweck mikroskopischer Untersuchung.
Untersuchung des Blutes . . . . . 142
I. Im frischen Präparat . . . . . 143
II. Deckglastrockenpräparate . . . . . 145
III. Blutschnitte nach Biondi . . . . . 155
IV. Schnittfärbung von Blutelementen und Zellkörnelungen . . . . . 155
V. Untersuchung der Blutplättchen . . . . . 158

Seite

VI. Fibrinbildung . . . . . 159
VII. Fremde Bestandteile im Blute . . . . . 159
VIII. Zählung der Blutkörperchen . . . . . 160
Untersuchung des Herzens und der Gefäße . . . . . 161
Untersuchung der Milz, des Knochenmarks und der Lymphdrüsen . . . . . 162
Untersuchung der serösen Häute . . . . . 163
Untersuchung der Haut . . . . . 164
Untersuchung der Schleimhäute . . . . . 165
Untersuchung von Magen und Darm . . . . . 165
Untersuchung der Leber . . . . . 166
Untersuchung des Pancreas . . . . . 168
Untersuchung des Harnapparates und des Harns . . 169
Untersuchung der Nebennieren und des chromaffinen Gewebes . . . . . 170
Untersuchung von Schilddrüse, Epithelkörperchen und Hypophyse . . . . . 171
Untersuchung des Respirationsapparates und des Sputums . . . . . 171
Untersuchung des männlichen und weiblichen Geschlechtsapparates . . . . . 173
Untersuchung des Knochensystems . . . . . 174
Untersuchung der Muskeln und Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeutel . . . . . 178
Untersuchung des Sehorgans . . . . . 178
Untersuchung des Gehörorgans . . . . . 180

XV. Kapitel. Mikroskopische Untersuchungen zu gerichtlichen Zwecken.
Untersuchung von Blutspuren . . . . . 180
Untersuchung der Haare . . . . . 183
Untersuchung der Samenflecken . . . . . 184
Untersuchung von Deciduaresten . . . . . 186

XVI. Kapitel. Über die Einsendung von Untersuchungspräparaten . . 186

XVII. Kapitel. Untersuchung des Nervensystems von Privatdozent Dr. Spielmeyer . . . . . 188
I. Untersuchung des Zentralnervensystems . . . . 190
A. Übersichtsbilder . . . . . 190
B. Färbung der Ganglienzellen . . . . . 192
C. Färbung der Achsenzylinder und Neurofibrillen 196
D. Färbung der Markscheiden . . . . . 198
E. Färbung der Neuroglia . . . . . 204
II. Periphere Nerven und Ganglien . . . . . 207
III. Methode der Methylenblauinjektion . . . . . 209

Erstes Kapitel.

# Mikroskop und Utensilien zur mikroskopischen Untersuchung.

## I. Das Mikroskop und seine Anwendung.

Die allgemeine Bekanntschaft mit dem Mikroskop wird in folgendem vorausgesetzt, da ja die Kenntnis der normalen Histologie Vorbedingung für pathologisch-histologisches Arbeiten ist. Es soll daher hier nur auf einige Hauptpunkte, insbesondere die für die pathologische Histologie erprobten Regeln eingegangen werden.

Jedem, der sich ein Mikroskop anschaffen will, ist anzuraten, daß er sich bezüglich der Wahl der Firma, der Auswahl des Instruments und seiner Prüfung an ein pathologisches Institut wendet. Folgende Firmen sind wegen der korrekten und gleichmäßigen Ausführung ihrer Fabrikate empfehlenswert:

E. Leitz, Wetzlar
C. Reichert, Wien
W. und H. Seibert, Wetzlar
C. Zeiß, Jena.

Alle diese optischen Werkstätten stellen Kataloge auf Verlangen zur Verfügung.

Als Stative sind für die meisten Zwecke mittelgroße ausreichend. Auch wer sich nicht von vorneherein Immersionslinse und Abbé'schen Beleuchtungsapparat anschaffen will, tut doch gut daran, bei der Wahl eines Stativs darauf Rücksicht zu nehmen, daß sich später noch diese für viele Zwecke unentbehrlichen Hilfsmittel anbringen lassen. Die grobe Einstellung des Tubus mit der Hand ist namentlich für Immersionslinsen gefährlich; sie wird durch ein Triebrad, wie es sich an den größeren Stativen befindet, wesentlich erleichtert. Sehr angenehm ist ein Stativ, das sich unterhalb des Objekttisches um eine frontale Achse in beliebigem Winkel umlegen läßt, da man dann von der Tischhöhe und der Anwesenheit eines besonders hohen Mikroskopierstuhles unabhängiger wird. Für viele Zwecke ist ein runder, drehbarer Objekttisch, der durch feine Schrauben etwas in beliebiger Richtung verschiebbar ist, von Vorteil. Zur systematischen Durchsuchung eines Präparats dienen die Kreuztische, die fest oder abnehmbar mit dem Stativ verbunden sein können. Sie gestatten das Präparat in zwei rechtwinklig zueinander stehenden Richtungen beliebig zu verschieben. Da jede Bewegung an

einer Skala mit Nonius abgelesen werden kann, lassen sich diese Kreuztische auch verwenden, um dieselbe Stelle des Präparats später wiederzufinden. Wer auch für eventuelle mikrophotographische Aufnahmen gerüstet sein will, kann besonders konstruierte Stative mit weitem Tubus wählen. Für die meisten Zwecke genügen die mittleren Stative (z. B. Zeiß IV und VIa, Leitz II, Seibert 6, Reichert H III und VI).

Von Objektiven ist eine schwache und eine stärkere Trockenlinse unbedingt erforderlich, die mit den gewöhnlichen Okularen eine Vergrößerung von 60—80, bezw. 300—400 ergeben (z. B. Zeiß A und Doder E, Leitz 3 und 6 oder 7, Seibert 3 und 5, Reichert 4 und 7). Für feinere Zellstudien und bakteriologische Untersuchungen ist noch eine $^1/_{12}$ homogene Ölimmersion nötig. Von Okularen wähle man etwa 1 und 3 und mache es sich zur Regel, für gewöhnlich schwache Okulare zu benutzen, da die Okularvergrößerung sowohl die Lichtstärke vermindert, als auch die Fehler der Objektivlinsen vergrößert. Nur die Apochromaten gestatten auch mit der Okularvergrößerung bedeutend höher zu gehen, sind aber auch beträchtlich teurer. An Auflösungskraft und Schärfe des Bildes werden sie aber von den gewöhnlichen Achromaten nicht erreicht. Was den Gebrauch der Objektive anlangt, so betrachte man prinzipiell jedes Präparat zunächst bei schwacher Vergrößerung; nur so gelingt es, eine Übersicht zu bekommen; in den meisten Fällen gelingt es, bei der schwachen Vergrößerung die veränderten Stellen zu finden, die man dann mit stärkeren Objektiven studieren muß. Zum bequemen Auswechseln der Objektive dienen Revolverapparate, d. h. drehbare Scheiben, an die meist 2—3 Objektive angeschraubt werden können. Die Schlitten-Objektivwechsler arbeiten noch genauer, sind aber für die gewöhnlichen Untersuchungen nicht nötig, für die Mikrophotographie jedoch von Vorteil.

Das Mikroskop ist vor Staub und direktem Sonnenlicht zu schützen, indem man es entweder in dem dazugehörigen Kasten oder Schränkchen aufbewahrt oder mit einer braunen Glasglocke bedeckt; weißes Glas kann man zweckmäßig zur Hälfte mit schwarzem Papier bekleben oder mit dunklem Lack anstreichen.

Feinere Verunreinigungen durch Staub entfernt man von den Okularen und von den Objektivlinsen mit einem dünnen Leinwandläppchen oder einem zarten Haarpinsel. Bei gröberen und fester anhaftenden Verunreinigungen wendet man Benzin oder Xylol an, muß sich aber hüten, daß man nicht etwa den Kanadabalsam, mit dem die einzelnen Linsen des Objektivs aneinander befestigt sind, löst.

Durch Drehen des Okulars läßt sich leicht entscheiden, ob etwa vorhandene Verunreinigungen dem Okular oder dem Objektiv anhaften.

Bei dem Gebrauch der Immersionslinse bringt man zwischen die Linse und die obere Fläche des Deckglases einen Tropfen von einem Öl, meist Zedernöl, oder einem Gemisch verschiedener Öle, welches dasselbe Brechungsvermögen hat wie das Glas, und durch welches die Luft mit ihrem von dem des Glases abweichenden Brechungskoeffizienten ausgeschaltet wird. Zur Einstellung wird der Tubus zunächst bis zum Kontakt der Linse mit dem Öltropfen gesenkt und mit dem Triebrad soweit eingestellt, daß ein verschwommenes Bild entsteht; dann wird die feine Einstellung mit der Mikrometerschraube bewirkt.

Zur Entfernung des Immersionsöles von der Linse bedient man sich eines feinen Leinwandläppchens, welches mit Benzin oder Xylol befeuchtet ist. Von dem Deckglas entfernt man das Immersionsöl ebenso, zweckmäßigerweise aber erst dann, wenn der Kanadabalsam fest geworden ist, und eine Verschiebung des Deckgläschens über dem Präparate nicht mehr möglich ist.

## Lichtquelle.

Am besten bedient man sich zu mikroskopischen Untersuchungen des Tageslichts; grelles Sonnenlicht eignet sich gar nicht, auch das vom blauen, unbewölkten Himmel stammende Licht ist seiner Farbe wegen nicht besonders zweckmäßig. Am meisten empfiehlt es sich, das Licht von einer weißen, nicht zu stark von der Sonne beleuchteten Wolke oder einer hellen Wand zu nehmen.

An jedem Mikroskop befinden sich Vorrichtungen, um die Intensität des Lichtkegels, der vom Spiegel auf das Präparat geworfen wird, dadurch beliebig abzuschwächen, daß die Öffnung in dem Objekttisch oder manchmal unter demselben verkleinert wird. Die einfachen Scheibenblendungen, die sich häufig noch an kleinen Mikroskopen befinden, sind minder empfehlenswert, weil sie nicht bis dicht an das Präparat herangebracht werden können, und weil sie das diffuse seitliche Licht nicht abzuhalten vermögen.

Durch den Mangel dieser Nachteile zeichnen sich die Zylinderblendungen aus, die in einem Schlitten unter dem Objekttisch von der Seite her vorgeschoben werden können und, sobald sie in der Achse der Tischöffnung angelangt sind, nach oben bis dicht an das Präparat vorgerückt werden. Sehr empfehlenswert sind die in Verbindung mit dem Abbé'schen Beleuchtungsapparat angewandten sog. Irisblenden, welche eine beliebige Abstufung der Lichtmenge durch einen einfachen Handgriff ermöglichen.

Je mehr Licht man auf ein Präparat einwirken läßt, desto mehr verschwinden die Strukturverhältnisse desselben, weil die feineren Konturen in dem ad maximum durchsichtig gemachten Präparate unsichtbar werden; dagegen treten die Farbenunterschiede deutlicher hervor. Daraus folgt, daß man für ungefärbte Präparate eine engere Blendung anwenden muß (Strukturbild), während für gefärbte eine weitere am Platze ist (Farbenbild).

Die stärkste Beleuchtung, die möglich ist: weite oder gar keine Blendung und dazu noch die Verstärkung des Lichts durch den Kondensor, wendet man bei der Untersuchung gefärbter Bakterienpräparate an. Man erreicht dadurch, daß in dem Präparate die gefärbten Bakterien umso deutlicher hervortreten, weil das Strukturbild, durch welches sie bei gewöhnlicher Beleuchtung leicht verdeckt werden, ganz oder fast ganz ausgeschaltet ist.

Ist man genötigt, sich des künstlichen Lichts beim Mikroskopieren zu bedienen, so korrigiert man die mehr oder weniger gelbe Farbe desselben dadurch, daß man zwischen die Lichtquelle und den Spiegel des Mikroskops entweder eine blaue Glastafel, oder auch eine sog. Schusterkugel einschaltet, d. h. eine Glaskugel, die mit einer durch

Ammoniakzusatz blaugefärbten Lösung von schwefelsaurem Kupferoxyd gefüllt ist. Auch dicht unter die Irisblende kann man eine blaue Glasscheibe einsetzen.

Das beste künstliche Licht zum Mikroskopieren ist Gasglühlicht, besonders das nach abwärts hängende; auch eine Nernstlampe mit mattem Glase ist zu empfehlen. Zwecks besonders intensiver Lichtwirkung kann man die Strahlen durch eine Schusterkugel oder eine Linse direkt auf den Spiegel des Mikroskops oder auf eine Mattscheibe konzentrieren. Außerdem sind noch besondere Mikroskopierlampen, auch für Petroleum, konstruiert worden, die jedoch nicht mehr als die angegebenen Vorrichtungen leisten.

Bei Benutzung des Kondensors oder des Abbé'schen Beleuchtungsapparates wird der Planspiegel eingeschaltet; ohne dieselben ist der Hohlspiegel von Vorteil. Bei künstlicher Lichtquelle wird der Beleuchtungsapparat zweckmäßig etwas etwas gesenkt.

Für besondere Untersuchungen kommen vor allem folgende Hilfsapparate in Betracht:

1) Zur Größenmessung mikroskopischer Teile dient ein Okularmikrometer; dasselbe stellt einen feinen auf Glas eingeritzten Maßstab dar, der entweder in ein vorhandenes Okular eingelegt oder in einem besonderen Okular angebracht ist. Der Wert jedes Teilstriches muß für jede Linse und Tubuslänge bestimmt werden, indem man feststellt, wie viel auf einen Teil des Objektmikrometers gehen; letzterer ist ein Objektträger, auf dem ein Millimeter in 100 gleiche Teile geteilt ist.

2) Zum Zeichnen benutzt man Bleistifte verschiedener Härtegrade oder Zeichenfeder und Tusche. Für farbige Zeichnungen nehme man Zeichenfeder und Pinsel, sowie verschiedenfarbige Tuschen und Aquarellfarben. Man kann glattes oder etwas rauhes Zeichenpapier anwenden (z. B. Schöller's Hammer).

Am besten ist es, wenn man die Zeichnungen in gleicher Höhe des Objekttisches anfertigt. Dafür gibt es besondere Zeichentische, die man sich aber auch selbst improvisieren kann. Besonders um die Umrisse und Größenverhältnisse rasch und genau wiederzugeben, dienen Zeichenapparate. Dies geschieht bei dem Edinger'schen Apparat dadurch, daß mittels einer kleinen elektrischen Bogenlampe und Linsen ein vergrößertes Bild des Präparats auf die Zeichenplatte geworfen wird; man braucht nur die Umrisse mit dem Stifte nachzufahren. Der Abbé'sche Zeichenapparat wird an das Mikroskop montiert. Durch ein über dem Okular angebrachtes Doppelprisma und einen seitlich angebrachten Spiegel wird die Zeichenfläche auf das Präparat reflektiert, so daß man mit der Bleistiftspitze den Konturen des Präparats folgen kann. Durch Zwischenschaltung von Rauchgläsern wird zu große Helligkeit der Zeichenfläche gedämpft. Das Zeichenokular von Leitz wird bei dem um 45° geneigten Mikroskop angewandt. Durch ein Prisma erscheint die Zeichenfläche hinter dem Mikroskop, die in der Tischebene liegt, in ähnlicher Weise wie bei dem vorigen Apparat auf das Präparat reflektiert. Zur Herstellung von Wandtafeln kann man das mit einem Projektionsapparat entworfene Bild nachzeichnen.

3) Zum Wiederfinden einer bestimmten Stelle des Präparats dienen entweder die oben erwähnten Kreuztische oder besondere Ob-

jektmarkierer; ein Apparat wird wie ein Objektiv angeschraubt und gestattet mit Farbe einen kleinen Kreis zu umzeichnen oder mit einem Diamanten in das Glas einzuritzen. Ein Apparat von Sachs-Mücke (zu haben bei Gebr. Mittelstraß, Magdeburg) besteht aus einem Gestell, das an das Objektiv angebracht wird. Durch 2 kleine Schraubstifte lassen sich zu beiden Seiten des Objekts auf den papierbeklebten Objektträger kleine Eindrücke bewerkstelligen. Werden diese später unter die Schraubenspitzen gebracht, so befindet sich wieder genau dieselbe Stelle des Präparats im Gesichtsfeld.

4) Für das Präparieren feiner Objekte ist eine Lupe empfehlenswert, die an einem Handgriff oder einem Stativ befestigt ist. Auch sind besondere Präparierstative käuflich zu haben, eventuell solche mit binokularer Lupe. Aus jedem Mikroskop kann man sich ein Präparierstativ herstellen, indem man bei eingeschaltetem Beleuchtungsapparat den Spiegel herausklappt. Auf den Fuß des Stativs legt man eine Glasplatte auf weißen Untergrund. Mit mittleren Vergrößerungen erblickt man dann von Objekten, die auf die Glasplatte gelegt werden, ein aufrechtes schwach vergrößertes Bild.

5) Heizbare Objekttische bestehen entweder aus einer Metallplatte, unter deren Fortsätze eine kleine Flamme gebracht wird, oder aus Metall- oder Glaskammern, durch die warmes Wasser geleitet ist. Die Temperatur kann an einem Thermometer abgelesen werden. Für längere Beobachtungen sind Heizschränke mit Thermoregulator konstruiert, in die das ganze Mikroskop hineingesetzt wird.

6) Zur Polarisationseinrichtung zwecks Untersuchung auf Doppelbrechung gehört ein Polarisator, aus einem Nicol'schen Prisma bestehend, das in eine Zylinderblendung eingeschoben oder in den Diaphragmenträger des Kondensors eingehängt wird. Darauf lassen sich noch Gipsplättchen (es genügt meist Rot 1. Ordnung) legen. Der drehbare Analysator wird entweder an dem Tubus über dem Okular befestigt oder ist in ein besonderes Okular gebaut. Stimmen die Schwingungsebenen von Analysator und Polarisator überein (parallele Nicols), so erscheint das Gesichtsfeld hell, stehen sie aufeinander senkrecht (gekreuzte Nicols), so erscheint das Gesichtsfeld dunkel. Bei dieser Stellung leuchten doppelbrechende Substanzen auf. Wird nun das Objekt mittels des drehbaren Objekttisches um 360° gedreht, so erscheint der doppelbrechende Körper 4 mal abwechselnd hell und dunkel, falls die optischen Achsen günstig gelagert sind. Seitlich einfallendes Licht muß möglichst abgeblendet werden. (Genaueres siehe Encyklopädie der mikroskopischen Technik, Artikel Polarisationsmikroskop.)

7) Zur Dunkelfeldbeleuchtung gehört eine möglichst intensive Lichtquelle. Auf die komplizierten und teuern Apparate kann hier nicht eingegangen werden. Für die praktisch wichtigen Zwecke, Auffinden ultramikroskopischer in Flüssigkeiten suspendierter Partikelchen und vor allem lebender Bakterien und Spirochaeten genügen die mit zentraler Scheibe versehenen Sternblenden von Zeiß oder der von Reichert konstruierte Plattenkondensor F. Der Apparat wird nach Entfernung des gewöhnlichen Kondensors auf dem Objekttisch mittels der Klammern befestigt und ein mit Diamant eingeritzter Kreis in die Mitte gerückt. Dann wird ein Objektträger von 1 mm Dicke mit dem zur Untersuchung bestimmten Präparat aufgelegt, nachdem ein Tropfen

Immersionsöl zwischen Kondensor und Objektträger unter Vermeidung von Luftblasen gebracht ist. Das mit einem gewöhnlichen Deckglas bedeckte Präparat wird nun mit einem mittleren oder starken Trockensystem betrachtet. Die Partikelchen, z. B. Spirochaeten erscheinen dann als helle Gebilde auf dunklem Untergrund.

8) Zur Beobachtung der Absorptionsspektren von mikroskopischen Objekten werden Mikrospektroskope angefertigt, die als Spektralokulare dem Mikroskop aufgesetzt werden, hier aber nur flüchtig erwähnt werden können.

## II. Sonstige Utensilien.

Die Objektträger sollen von weißem Glase sein. Am bequemsten ist das sogenannte englische Format. Zur Bezeichnung dienen Fettfarbstifte oder Glastinte. Wenn man ganz dünne Kanadabalsamlösung fein auf Glas verreibt, kann man auch mit gewöhnlicher Tinte darauf schreiben. Am besten ist Aufkleben von Papieretiketten oder Schutzleisten von Pappdeckel. In letzterem Falle kann man viele Präparate aufeinander legen. Die Befestigung geschieht mit sirupdicker spirituöser Schellacklösung oder mit Dextrinlösung oder dem käuflichen Schutzleistenkitt.

Die Deckgläschen dürfen im allgemeinen nicht dicker als 0,16 mm sein. Man hält sich solche von verschiedener Größe vorrätig je nach der Größe der einzulegenden Schnitte.

Als billiger Ersatz für Deckgläschen werden, besonders bei großen Schnitten und solchen, die nicht länger aufgehoben werden sollen, Glimmerplättchen empfohlen, die man fertig beziehen oder sich selbst abspalten und zurechtschneiden kann.

Objektträger und Deckgläschen werden durch Einlegen in eine Schale mit Spiritus und nachheriges Abtrocknen mit einem feinen Leinwandlappen gereinigt.

Außerdem bedarf man einer Anzahl von Glasschälchen in verschiedenen Größen, in denen das Färben, Auswaschen der Präparate usw. ausgeführt wird. Zum Aufbewahren von Schnittpräparaten, die nicht sofort eingelegt werden, dienen Glasdosen, die mit einem Deckel verschlossen werden können.

Ferner werden Glastrichter, Flaschen, Pipetten, Glasstäbe, Reagenzgläser, Kapillarröhren und Meßgefäße gebraucht. Der Glasnadeln bedient man sich, wenn man mit Metallösungen arbeitet und zur Ausführung der Eisenreaktion.

Will man viele Schnitte (Gefrier- oder Paraffinschnitte) auf einmal färben, so kann man sich der Siebdosen nach Steinach bedienen (zu haben bei Grübler & Co., Leipzig). Dieselben bestehen aus einer Glasdose mit siebförmig durchlöchertem Boden, die der Reihe nach in mehrere größere Dosen mit verschiedenen Reagentien eingesetzt wird.

Um gleichzeitig mehrere Paraffinschnitte zu behandeln, die auf Objektträger aufgeklebt sind, kann man Glaskästchen mit Riffen benutzen. Demselben Zweck dienen für auf Deckgläschen aufgeklebte Paraffinschnitte kleine Apparate von Hoffmann (zu beziehen von Dröll, Heidelberg), die aus Metallplättchen und einer Spiralfeder bestehen, zwischen deren einzelne Windungen man die Deckgläser festklemmt. An einem kleinen Handgriff kann man den ganzen Apparat bequem in die einzelnen Farblösungen eintauchen.

Das Reinigen gebrauchter Objektträger und Deckgläser kann geschehen, nachdem man sie einige Tage in Xylol eingelegt hat und dann abputzt. Oder man kocht sie in 10-proz. Lysollösung unter dem Abzug und spült das Gefäß längere Zeit mit fließendem Wasser durch.

Bezugsquellen für Glaswaren sind:

Lautenschläger, Berlin, Chausseestraße 92 und
Frankfurt a. M. Kaiserstraße 53.
Altmann, Berlin, Luisenstraße.
Wagner & Munz, München, Karlstraße 43.

Von Metallinstrumenten kommen in Gebrauch: Präpariernadeln, Pinzetten, Scheren, Skalpells, Spatel usw.

Die Präpariernadeln müssen immer vollständig blank und frei von jeder Rauhigkeit sein, weil sonst feine Schnitte leicht an denselben hängen bleiben. Man kann die Präpariernadeln, wenn sie rauh geworden sind, auf feinem Glaspapier abschleifen und nachher auf einem Leder noch glätten. Am zweckmäßigsten sind diejenigen Präpariernadeln, bei welchen die Nadel an einem Stiele angeschraubt und dementsprechend jedesmal, wenn sie schlecht geworden ist, durch eine neue ersetzt werden kann.

Sehr brauchbar ist ferner zu allen Manipulationen, zum Auffangen und Übertragen von Schnitten, zum Entfernen der Schnitte von der Schneide des Mikrotommessers usw. eine silberne, biegsame, oben stumpfe Nadel.

Zum Übertragen der Schnitte aus einer Flüssigkeit in die andere, namentlich von Wasser in Alkohol, sowie zum Ausbreiten derselben auf dem Objektträger dient dann ein Spatel. Am zweckmäßigsten sind solche von dünnem Platinblech oder Neusilber, die sich in allen beliebigen Größen, auch so, daß sie für größere Übersichtsschnitte, z. B. des Zentralnervensystems, ausreichen, herstellen lassen.

Von den dickeren Messingspateln lassen sich die Schnitte nicht so gut abziehen und ausbreiten. Außerdem werden dieselben durch verschiedene Reagentien angegriffen.

Für Deckglaspräparate sind Cornet'sche Pinzetten, oder vorn breite und abgebogene Deckglaspinzetten zu empfehlen.

---

## Zweites Kapitel.

# Untersuchung frischer Präparate.

Die frische Untersuchung gewährt sowohl häufig den raschesten diagnostischen Aufschluß, als auch zeigt sie in manchen Fällen Zellveränderungen, die am gehärteten Präparat nicht so gut wahrgenommen werden können, z. B. trübe Schwellung. Vor allem sind Lebenserscheinungen und Flimmerung natürlich nur am frischen Objekte zu studieren. Daher sollte der Fixierung eine frische Untersuchung vorausgehen. Diese kann vorgenommen werden

1) An Flüssigkeiten. (Urin, Transsudate, Exsudate, Blut, Eiter, Cysteninhalt usw.) Man kann oft einfach ein kleines Tröpfchen auf

den Objektträger bringen und mit einem Deckglas bedecken, oder man untersucht, entsprechend den Bakterienpräparaten, im hängenden Tropfen. Ist die Flüssigkeit zu zellreich, so verdünnt man mit physiologischer Kochsalzlösung, ist sie sehr zellarm, so läßt man sie in einem Spitzglas sedimentieren oder gewinnt die festen Bestandteile durch Zentrifugieren. Zur genaueren Untersuchung kann man unter dem Deckglas die später genannten Reagentien mit Fließpapier hindurchsaugen.

Um Zellen längere Zeit zu untersuchen und der Einwirkung von Reagentien auszusetzen, kann man nach Arnold feine Scheiben von getrocknetem Holundermark auf dem Mikrotom schneiden (fertig zu beziehen von Jung-Heidelberg), sterilisieren und mit dem Material beschicken oder in den Tierkörper bringen. Dann bringt man das Plättchen auf ein Deckglas und dieses auf einen hohlgeschliffenen mit Vaselin umrandeten Objektträger.

2) An Gewebsstückchen, die der Leiche oder dem Lebenden entnommen sind. Je nach Natur und Konsistenz des Gewebes verfährt man verschieden:

a) Abstrichpräparat. Man stellt sich eine frische Schnittfläche her, streicht mit einem trockenen Skalpell darüber und bringt das anhaftende Material meist in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf den Objektträger. So untersucht man z. B. oft weiche Geschwülste und parenchymatöse Organe (Milz, Leber, Pneumonie). Auch die Innenwand von Cysten kann man auf diese Weise abstreichen (Echinococcus, Flimmerepithel).

b) Quetschpräparat. Ein kleines Gewebspartikelchen wird auf den Objektträger gebracht und ohne Zusatzflüssigkeit leicht mit dem Deckgläschen zerquetscht; das Verfahren ist besonders geeignet für Untersuchung von Gehirn und Rückenmark auf Fettkörnchenzellen, verkalkte Ganglienzellen, Pigmente usw.

c) Zupfpräparat. Bei festeren Geweben (Herz, Trichinenmuskeln, Geschwülste usw.) bringt man ein Partikel in Zusatzflüssigkeit und zerzupft mit zwei spitzen Nadeln so lange, bis mit bloßem Auge keine gröberen Teile mehr vorhanden sind. Gelingt das Zerzupfen nicht, so kann man erst eine der unten angeführten Mazerationsflüssigkeiten benutzen.

d) Scherenschnitt. Von der gespannten Schnittfläche werden mit einer gebogenen Schere flache Stückchen entnommen und mit dem Deckglas etwas breitgedrückt (Fettembolie der Lungen).

e) Rasiermesserschnitte. Das von Fett gereinigte Messer wird nach jedesmaligem Eintauchen in Wasser über die Schnittfläche mit ziehender Bewegung hinübergeführt und der erhaltene Schnitt in Wasser oder Kochsalzlösung vom Wasser abgespült. Vorteilhaft ist Einklemmen der Stücke in gehärtete Amyloidleber. Das Schneiden mit dem Rasiermesser erfordert große Übung und kann ersetzt werden durch

f) Doppelmesserschnitte. Das Doppelmesser besteht aus zwei gegeneinander verstellbaren Klingen, die möglichst scharf sein müssen und ebenfalls fettfrei gemacht werden müssen. Nach Eintauchen des Messers in Wasser werden die Schneiden auf eine Schnittfläche des Organs aufgesetzt und mit geringem Druck ziehende Bewegungen ausgeführt. Vor dem Herausziehen muß der Schnitt durch leichte seitliche Bewegungen an der Basis abgeschnitten werden. Nach Öffnen des

Doppelmessers gelingt es leicht, den Schnitt in Wasser oder Kochsalzlösung abzuschwemmen und auf einen Objektträger auszubreiten.

g) Gefriermikrotomschnitte von frischen Objekten sind nicht empfehlenswert, da durch das Gefrieren die Gewebsstruktur stark geschädigt wird. Man wendet dann besser eines der später angeführten Schnellfixierungsverfahren an.

Die meisten frischen Untersuchungen werden in Zusatzflüssigkeiten ausgeführt. Diese haben entweder den Zweck, die Zellen unter möglichst den Körperverhältnissen entsprechenden Verhältnissen zu untersuchen (indifferente) oder ihren geweblichen Zusammenhang zu lockern (Mazerations- und Isolationsflüssigkeiten) oder durch bestimmte Reagentien besondere Strukturbestandteile hervortreten zu lassen oder unsichtbar zu machen, eventuell auch mikrochemische Reaktionen auszulösen.

Für alle Zusatz- und Untersuchungsflüssigkeiten mikroskopischer Präparate gilt als Regel, daß man nur einen kleinen Tropfen davon auf den Objektträger bringt. Nimmt man zuviel Flüssigkeit, so liegt das Deckglas nicht fest auf und schwimmt entweder selbst weg oder es geraten wenigstens die einzelnen Zellen im Präparat in eine für die Untersuchung sehr störende Bewegung. Außerdem hindert oder verlangsamt die Untersuchungsflüssigkeit, wenn sie in zu großer Menge zugesetzt ist, die Einwirkung anderer Reagentien, die man etwa noch anwenden möchte.

Wenn es sich um Bakterienbefunde in frischen Präparaten handelt, so darf man niemals außer acht lassen, daß schon im destillierten Wasser, noch mehr aber in der Kochsalzlösung Bakterienentwicklung stattfinden kann, und daß Bakterien, die sich im Präparat finden, eventuell auch aus der Zusatzflüssigkeit stammen können, namentlich wenn dieselbe nicht mehr frisch ist.

## I. Indifferente Zusatzflüssigkeiten.

Kochsalzlösung hat vor dem Wasser den Vorzug, daß die Gewebe nicht so aufquellen, und die feineren Strukturen in ihr erhalten bleiben. Isotonisch ist sie für den Warmblüter 0,9 Proz., für den Kaltblüter 0,6 Proz.

Sog. künstliches Serum kann man sich dadurch bereiten, daß man 9 Teile der Kochsalzlösung mit 1 Teil Hühnereiweiß versetzt. In einer derartigen Zusatzflüssigkeit verharren die Zellen länger in lebensfähigem Zustande. Ähnliche Vorteile bilden seröse Flüssigkeiten, Blutserum, Hydroceleflüssigkeit usw.

## II. Mazerations- und Isolationsflüssigkeiten.

Zur Erleichterung des Zerzupfens in feinste Teilchen dienen die folgenden Flüssigkeiten, in die man die Stückchen für 24 Stunden oder länger legt.

Wenn man tierische Organstückchen mittels einer Isolationsmethode untersucht, so gilt als Regel, daß man die betreffenden Stückchen sofort nach der Tötung des Tieres in die gewählte Isolationsflüssigkeit überträgt. Menschliche Organteile sollen ebenfalls so

frisch wie möglich der Einwirkung der Isolationsflüssigkeit ausgesetzt werden.

Man nimmt die Isolation in kleinen Uhrschälchen vor; das Volumen der Flüssigkeit darf das des Stückchens nicht zu sehr übersteigen, weil sonst mehr eine Härtung als eine Isolation erzielt wird.

1) 33-proz. Alkohol, der sog. $^1/_3$-Alkohol von Ranvier, hergestellt durch Vermischen von 1 Teil von 96-proz. Spiritus mit 2 Teilen Wasser.

2) Ganz dünne Chromsäurelösungen, 0,01—0,03-proz., sind für viele Fälle sehr geeignet.

3) 0,1-proz. Osmiumsäure, 12—24 Stunden lang zur Einwirkung gebracht, ermöglicht eine sehr gute Isolation und ist namentlich angezeigt, wenn es sich um verfettetes Gewebe handelt.

4) Methode von Arnold: das Stückchen kommt für 5—10 Minuten in 0,1-proz. Essigsäure, dann für 24—28 Stunden in 0,01-proz. Chromsäure. Nachbehandlung mit Pikrokarmin usw. ist möglich.

5) Eine weitere Methode von Arnold, die sich bei Zelluntersuchungen sehr bewährt hat, beruht in der Anwendung von Jodjodkalilösungen. Zu 10 Teilen einer 10-proz. Jodjodkalilösung werden 5—10 Tropfen einer Lösung von 5 g Jod und 10 g Jodkali in 100 ccm Wasser zugefügt. Wenn die Flüssigkeit heller wird, gibt man wieder einige Tropfen der letzteren Lösung zu. Lockeres Gewebe in kleinen Stückchen kann bald untersucht werden, festeres nach 12—48 Stunden. Bei Muskeln und Ganglienzellen des Rückenmarks sind 4—8 Tage und wiederholtes Schütteln im Reagenzglas nötig.

6) 33-proz. Kalilauge. In dieser zerfallen die Stückchen schon innerhalb einer Stunde. Ihre Anwendung empfiehlt sich namentlich bei der Untersuchung von glatten Muskelfasern, z. B. aus Tumoren des Uterus usw. Die Untersuchung muß ebenfalls in 33-proz. Kalilauge geschehen, weil bei Verdünnung derselben mit Wasser die Zellen zerstört werden (s. S. 11).

7) Die Müller'sche Flüssigkeit (s. S. 16) ist ebenfalls zur Isolation, namentlich für Teile des Nervensystems, sehr geeignet. Die Präparate verweilen in der Flüssigkeit 2—3 Tage.

8) Ganz dünne Formalinlösungen, 2 ccm Formol auf 1000 ccm physiologische Kochsalzlösung.

Bei Anwendung der Isolationsflüssigkeiten kann die Untersuchung in einem Tropfen derselben vorgenommen werden. Doch ist meist auch die Untersuchung in Wasser oder in Kochsalzlösung möglich.

## III. Reagentien.

1) Das **Glyzerin.** Es hat außer seiner aufhellenden Eigenschaft den Vorteil, daß es nicht verdunstet und sich chemisch nicht verändert; es können daher die in ihm verteilten Präparate, wenn man sie gegen den Luftzutritt abschließt, konserviert werden. Man verwendet das Glyzerin meist in unverdünnter Form, seltener mit Wasser vermischt. Frische Präparate werden, wenn es sich nicht etwa um die Untersuchung von Pigment handelt, so stark aufgehellt, daß die Untersuchung in Glyzerin nicht statthaft ist. Dagegen kommt das Glyzerin sehr oft in Anwendung bei der Untersuchung ungefärbter Schnitte, die schon

gehärtetem Material entstammen, sowie bei gefärbten Präparaten, die eine Alkoholbehandlung nicht vertragen (Fettfärbung, Amyloidreaktion).

2) **Kali aceticum,** in gesättigter wässeriger Lösung (50-proz.) besitzt ebenfalls eine aufhellende Wirkung, die aber geringer ist als die des Glyzerins, so daß auch frische Schnitte darin untersucht werden können. Die Präparate können in der Lösung ähnlich wie im Glyzerin konserviert werden.

3) **Essigsäure.** Sie hat den doppelten Vorteil, daß sie die Kerne zum Schrumpfen bringt und dadurch ihre Umgrenzung deutlicher hervortreten läßt, und daß sie das Bindegewebe zur Quellung bringt und so durchsichtiger macht. Fetttröpfchen widerstehen der Einwirkung der Essigsäure, während diese anderseits die Eiweißkörnchen, die sich im Protoplasma der Zellen bei der trüben Schwellung bilden, unsichtbar macht. Es ist daher die Essigsäure ein ausgezeichnetes Reagens für die Differentialdiagnose zwischen fettiger Degeneration und körniger Trübung. Mikrokokken bleiben ebenfalls von der Essigsäure unbeeinflußt. Auch die elastischen Fasern werden durch die Essigsäure nicht verändert und treten daher bei ihrer Anwendung in dem durchsichtig gemachten Bindegewebe deutlicher hervor.

Man wendet die Essigsäure meist in einer 1—2—5-proz. starken Lösung an, die man sich durch Verdünnen von Eisessig mit Wasser herstellt. In der Regel bringt man von der Essigsäure vermittelst eines Glasstabes einen Tropfen an die Seite des Deckglases, nachdem man das Präparat vorher schon angesehen hat. Die Essigsäure dringt dann langsam ein und man kann ihre Wirkung unter dem Mikroskop verfolgen. Das Eindringen der Essigsäure wird beschleunigt, wenn man an den entgegengesetzten Rand des Deckglases ein Stückchen Fließpapier bringt, welches die Flüssigkeit ansaugt.

Fuchsinessigsäure besitzt noch in erhöhtem Maße die Fähigkeit, den Kern deutlicher hervortreten zu lassen, weil sie nicht nur seine Konturen besser zum Vorschein bringt, sondern ihn auch färbt. Man stellt die Fuchsinesssigsäure her, indem man zu der 2-proz. Essigsäure so viel Fuchsin gibt, daß die Farbe eine gesättigt rote wird.

Schließlich wendet man die Essigsäure auch noch an, um den Kalk in verkalkten Geweben zu lösen.

4) **Schwache wässerige Jodlösung** ist ebenfalls ein sehr bequemes Mittel, um die Kerne oder die Umrisse der Gewebe überhaupt deutlicher zur Anschauung zu bringen. Man stellt die schwache Jodlösung her, indem man die gewöhnliche Lugol'sche Lösung (Jod 1, Jodkali 2, Wasser 100), so weit mit Wasser verdünnt, daß sie eine weingelbe Farbe annimmt.

5) **Kali- und Natronlauge.** Die Wirkung und demnach die Anwendungsweise ist eine ganz verschiedene, je nach dem Konzentrationsgrade.

Die 1—3-proz. schwache Kalilauge hat die Fähigkeit, die meisten Gewebe aufzulösen. Es widerstehen ihr von den gewöhnlich in Betracht kommenden Gewebsbestandteilen nur: a) das elastische Gewebe, b) die Fette, c) Pigmente, d) Bakterien.

Man kann daher bei der Untersuchung der genannten Dinge, namentlich zu differentiell-diagnostischen Zwecken, passend Gebrauch

von der schwachen Kali- oder Natronlauge machen. Auch die Amyloidsubstanz ist resistent gegen die schwache Lauge, es kommt aber diese Eigenschaft bei mikroskopischen Untersuchungen selten zur Geltung, weil es spezifische Reaktionen auf Amyloid gibt.

Die 33-proz. starke Kali- und Natronlauge zerstört die zelligen Gewebsbestandteile nicht, sie löst dagegen die Kittsubstanz, welche dieselben verbindet, und wird daher zur Isolierung von Geschwulstzellen, glatten Muskelfasern, Drüsenknäueln usw. verwandt. Diese Auflösung wird meist schon in wenigen Minuten bewirkt; es dürfen aber danach die Teile nicht mit destilliertem Wasser in Berührung kommen, weil sonst eine Verdünnung der Lauge bewirkt wird, und die Wirkungsweise der verdünnten Kalilauge eintritt. Es muß vielmehr die Untersuchung in der starken Kalilauge selbst vorgenommen werden (s. S. 10).

**6) Osmiumsäure.** Dieselbe wird in 1-proz. wässeriger Lösung angewandt und kann in derselben Weise wie die Essigsäure dem vorher zerzupften und mit einem Deckglas bedeckten Präparat zugesetzt werden. Sie hat die Eigenschaft, Fetttröpfchen braun bis schwarz zu färben, und ist daher ein wertvolles Reagens zum Nachweis von Fett, namentlich auch bei der fettigen Degeneration.

**7) Formalin in ganz dünnen Lösungen.** Man kann diesem auch etwas Farbstoff, z. B. Methylenblau, Thionin, Eosin zusetzen.

**8) Salzsäure,** 3—5-proz. Dient zum Erkennen von Verkalkungen, Kalkkonkrementen usw. Sie löst den phosphorsauren Kalk einfach auf und es werden daher die vorher dunklen Partien hell. Die Lösung des kohlensauren Kalkes vollzieht sich unter Bildung von Gas($CO_2$)-Bläschen.

**9) Färbung frischer Präparate** wird, wenn man nicht die Deckglastrockenmethode anwendet, so bewirkt, daß man vom Rande her einen Tropfen wässeriger Farblösung, am besten Methylgrün oder Löffler's Methylenblau (s. S. 101) oder auch Fuchsinessigsäure (s. S. 11) zufließen läßt. Die Zellen werden dabei natürlich abgetötet.

## IV. Vitale und supravitale Granulafärbung.

Gegenüber neueren Kritiken unserer Fixations- und Färbemethoden, wonach ein mehr oder weniger großer Teil der Zellstrukturen im fixierten Objekt Artefakte sein sollen, ist es von Wichtigkeit, daß wir eine Anzahl Farbstoffe besitzen, denen gegenüber sich die lebende und überlebende Zelle nicht so ablehnend verhält, wie es die frühere Ansicht von der Unfärbbarkeit der lebenden Substanz voraussetzte. Es gelingt mit diesen Methoden, sowohl in Zellen, die schon im ungefärbten frischen Präparat Granulierung erkennen lassen, als auch in anderen, in denen dies kaum oder gar nicht möglich ist, distinkt gefärbte Körnchen in verschiedener Menge und Anordnung sichtbar zu machen. Die hierbei entstehenden überraschend zierlichen Bilder sind geeignet, dem Beobachter eine bessere Vorstellung von dem Zellbaue zu verschaffen, als es oft die kompliziertesten Fixierungs- und Färbungsmethoden gestatten. Zudem kann man den allmählichen Eintritt der Färbung sowie etwa noch fortbestehende Bewegungserscheinungen dabei direkt unter dem Mikroskop verfolgen.

Die praktisch wichtigsten unter den hierher gehörigen Farbstoffen

sind das vitale, rektifizierte Methylenblau von Ehrlich und als geeignetster das Neutralrot. Man verwendet dieselben in sehr starker Verdünnung, so daß die Flüssigkeiten ganz leicht gefärbt sind; für manche Zwecke benutzt man Methylenblauverdünnungen bis 1 : 100000 und noch schwächer. Neutralrotlösungen können etwas stärker sein, da es für die Zelle noch ungiftiger zu sein scheint. Zum Studium der Methode nimmt man nach dem Vorgange von Fischel (Untersuchungen über vitale Färbung, Anatom. Hefte, H. 52, 1901 und Encyklopädie der mikroskopischen Technik, Artikel „Färbungen, intravitale"), am besten Amphibienlarven, die man direkt in der dünnen Farblösung schwimmen läßt und deren Weiterentwicklung trotz intensiver Färbung im ganzen ungestört verläuft. Zur Untersuchung betäubt man die Tiere auf dem Objektträger z. B. mit Zigarrenrauch und kann den Schwanz unter einem Deckglase bequem mit Immersion betrachten; man kann auch den Schwanz abschneiden oder das übrige Tier zerquetschen. Auch am lebenden Frosch kann man prachtvolle Granulierung erhalten, wenn man nach Arnold die Zunge des curarisierten Tieres hervorschlägt, befestigt und mit kleinen Neutralrotkörnchen betäubt; hierbei bleibt Zirkulation und Funktion des Wimperepithels erhalten. Zu den meisten Untersuchungen muß man jedoch die Organe aus ihrem physiologischen Zusammenhang bringen. Entweder hat man nun schon im Leben durch Substanz oder Lösung die Färbung hervorgebracht, oder man legt die Teile nachträglich in Farblösung. Da letztere Bilder im allgemeinen mit ersteren übereinstimmen, ist man berechtigt, diese supravitale Färbung als eine überlebende Funktion der Zelle anzusehen. Das Bild, das eine derart gefärbte Zelle bietet, ist völlig charakteristisch. Der Kern ist meist ungefärbt und völlig unsichtbar; man sieht seine Lage durch das Fehlen der Granula, die den übrigen Zellleib oft in dichter Weise durchsetzen. An abgestorbenen Zellen verschwindet die Granulafärbung und macht einer diffusen Kernfärbung Platz. Vorbedingung für das Gelingen ist die peinlichste Fernhaltung mechanischer, chemischer oder physikalischer Zellschädigungen. Als Untersuchungsflüssigkeit und Lösungsmittel verwendet man physiologische Kochsalzlösung. Ein Objekt, bei dem man vitale und supravitale Färbung gut vergleichen kann, ist die von Arnold empfohlene Froschcornea. Entweder bringt man Farbstoff in Substanz in den Konjunktivalsack oder man legt den herausgenommenen Bulbus oder die Cornea in die Farbstoffkochsalzlösung.

Bei höheren Tieren steigern sich die Schwierigkeiten bei der Untersuchung. Am leichtesten geht es noch mit gut isolierbaren Zellen (Blut, Knochenmark), die man in Holundermark mit Farbstoffzusatz untersuchen kann. Von den übrigen Organen muß man kleine Scheren- oder Messerschnitte anfertigen, die Farbflüssigkeit soll in flachen Schalen sein und der Luft Zutritt gewährt werden. Auch Doppelmesserschnitte geben oft gute Resultate. Die Präparate brauchen nicht so dünn wie für die sonstigen Färbungen zu sein, da die elektive Granulafärbung auch bei dickeren Schnitten Untersuchung mit der Immersion gestattet. Von menschlichem Material kann nur solches von ganz frischen Sektionen (2—3 Stunden nach dem Tode), am besten aber direkt von Operationen Verwendung finden. Sehr schöne Bilder erhält man z. B. von Strumen.

Die Fixierung ist leider in befriedigender Weise bisher noch nicht gelungen. Am ehesten kommt man noch mit den Fixierungsverfahren von Bethe (s. unter Nervensystem) zum Ziele. Über die Fixierung des Neutralrots hat neuerdings Golovine (Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 1902, S. 176) Verfahren veröffentlicht. Für Methylenblaupräparate gibt Schmidt, Pflügers Archiv 113. Bd. 1906 eine Methode der Fixierung an.

Durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion von indigschwefelsaurem Natron oder Lithionkarmin in Versuchstiere erhält man in verschiedenen Geweben intracelluläre granuläre Farbstoffabscheidungen. Diese Organe kann man fixieren, auf dem Gefriermikrom oder nach Einbettung schneiden, und Kontrastfärbungen der Kerne anwenden (cf. Ribbert, Zeitschr. f. allgem. Physiologie, Bd. IV 1904 und Schlecht, Zieglers Beiträge 40. Bd. 1906).

Über vitale Färbung des Knochens s. bei Knochen.

---

Drittes Kapitel.

## Fixierung und Härtung der Präparate.

Die Härtung bezweckt eine Vermehrung der Konsistenz, die uns genügend dünne Schnitte gewinnen läßt. Zu diesem Zwecke werden durch physikalische, z. B. Kochen oder physikalisch-chemische Einwirkungen die Eiweißstoffe koaguliert. Da auch die Fixierung, deren Zweck in möglichst lebenswahrer Aufbewahrung der Zell- und Gewebsstrukturen besteht, mit Eiweißfällung einhergeht, lassen sich beide Prozesse praktisch nicht trennen und werden durch die folgenden Methoden gleichzeitig bewirkt. Man bringt von möglichst frischen Organen dünne Scheiben in reichliche Mengen (etwa das 10—20fache Volumen) der Fixierungsflüssigkeit; den freien Zutritt letzterer gewährleistet man eventuell durch eine Schicht Watte oder Fließpapier. In den meisten Fällen kann das Eindringen der Flüssigkeiten durch höhere Temperaturen, z. B. im Brütschrank, beschleunigt werden.

**1) Alkohol** wird für manche Zwecke von vornherein als Fixierungsmittel gebraucht (z. B. für gewisse Färbungen des Zentralnervensystems, für Glykogenpräparate). Man wendet Konzentrationen von 90—100-proz. an. Oft empfiehlt es sich, die Stücke zunächst in 90- bis 96-proz. Spiritus und erst am folgenden Tage in absoluten Alkohol zu bringen, weil sie dann weniger schrumpfen.

Die in Alkohol zu härtenden Stücke werden in Würfel- oder in Scheibenform ausgeschnitten und sollen nicht mehr als 2—3 cm im Durchmesser haben. Die Menge des Alkohols soll 10—15 mal größer sein als das Volum der Stücke. Am 2. und 4., nötigenfalls auch noch am 6. Tage muß der Alkohol gewechselt und durch frischen ersetzt werden. Sehr ratsam ist es, das Glas am 1. Tage zu verschiedenen Malen zu schütteln, weil sonst leicht einzelne Stücke am Boden festkleben und der Alkohol dann an deren unterer Seite nicht mehr zur Einwirkung gelangen kann, oder Watte unterzulegen.

Die Alkoholhärtung kann für die meisten Gewebe zur Anwendung kommen und ist besonders dann am Platze, wenn die Untersuchung der betreffenden Teile schnell vorgenommen werden soll. Ferner ist sie für Präparate, die auf Bakterien untersucht werden sollen, ganz vorzugsweise und mehr als die anderen Härtungsflüssigkeiten zu empfehlen. Man wählt hier von vornherein absoluten Alkohol, um die postmortale Weiterentwicklung der Bakterien im Gewebe sicher auszuschließen und die Färbbarkeit derselben so gut wie möglich zu erhalten.

Härtung und Fixierung in absolutem Alkohol ist notwendig zur Konservierung des Glykogens, da alle wässerigen Flüssigkeiten Glykogen lösen.

Die primäre Alkoholfixierung wird jetzt viel seltener angewandt und durch andere Methoden ersetzt. Dagegen dient der Alkohol in steigenden Konzentrationen zur Nachhärtung und Entwässerung anders fixierter Präparate (siehe Einbettung).

Um sich selbst absoluten Alkohol aus 96-proz. zu machen, setzt man letzterem ausgeglühtes Cuprum sulfuricum hinzu. Dasselbe wird in einem Metalltiegel so lange geglüht, bis es zu einem weißen Pulver geworden ist. Wenn es in dem Spiritus blau geworden ist, muß es durch neues ersetzt oder von neuem ausgeglüht werden. Derartigen selbstbereiteten absoluten Alkohol muß man aber vor dem Gebrauch durch ein Filter gießen, weil sonst Kupferpartikelchen mit dem Präparat in Berührung kommen könnten. Bei subtileren Untersuchungen empfiehlt es sich dagegen, absoluten Alkohol anzuwenden, weil er vor dem künstlich entwässerten Spiritus den Vorzug chemischer Reinheit hat. Auf dieselbe Weise kann man sich auch den absoluten Alkohol dauernd wasserfrei erhalten.

Um sich z. B. aus 96-proz. Alkohol 70-proz. herzustellen, berechnet man sich die für 100 Teile nötige Menge nach der Formel $X = \frac{100 \cdot 70}{96} = 72{,}9\ldots$, man muß also 73 Teile des 96-proz. Alkohols und 27 Teile destillierten Wassers mischen. Für andere Konzentrationen setzt man einfach die entsprechenden Zahlen in die Formel ein.

**2) Azeton** wirkt ebenfalls stark wasserentziehend, hat aber auch den Nachteil starker Schrumpfung. In Anwendung kommt es für Schnelleinbettungen (siehe S. 30 u. 32) sowie zum Entwässern und als Übergangsmedium bei der Paraffineinbettung.

**3) Formalin** (Formol) ist eine 40-proz. konzentrierte Lösung von Formaldehyd in Wasser. Diese Stammlösung wird am besten in braunem Glase aufgewahrt, da sie vom Lichte zersetzt wird. Durch 4fache Verdünnung stellt man sich eine 10-proz., durch 10fache eine 4-proz. Formalinlösung her. Man meint also mit der Prozentangabe den Gehalt an Formaldehyd. Man wendet meist die 4-proz. Lösung an, oft aber auch, besonders für Gehirn und Rückenmark (siehe d.) eine 10-proz. Bezüglich der Zeitdauer der anzuwendenden Einwirkung bestehen weite Grenzen. Kleine Stücke sind schon in 4—6—8 Stunden hinreichend fixiert und gehärtet, größere Objekte muß man bis mehrere Tage darin belassen. Es schadet übrigens auch kleinen Stücken nichts, wenn sie länger in Formalin liegen bleiben. Bei Fixierung in der Wärme (Brutschrank oder Paraffinofen) kann die Zeit noch weiter abgekürzt werden. Da man die Stücke aus dem Formalin direkt oder nach kurzem Auswässern auf dem Gefriermikrotom schneiden kann, lassen sich bei eiligen Fällen in 1—2 Stunden oder noch rascher gute Präparate herstellen.

Die Formalinhärtung bietet so zahlreiche Vorteile, daß sie die häufigst angewandte ist. Die Härtung geht sehr rasch vor sich und bewirkt eine zum Schneiden vorzüglich geeignete Konsistenz. Die stark antiseptische Wirkung verhindert ein Weiterwachsen von Bakterien oder Schimmelpilzen. Die meisten Färbeverfahren lassen sich nach Formalinhärtung ausführen. Das Fett wird in vollkommener Weise erhalten, so daß die Färbung mit den neueren Fettfarbstoffen ermöglicht wird. Die roten Blutkörperchen werden durch Formalin in ihrer natürlichen Farbe besonders gut erhalten und färben sich mit Eosin leuchtend rot, so daß in allen Fällen, in welchen auf das Hervortreten des Blutes in den Präparaten Wert gelegt wird, die Formalinhärtung in erster Linie angezeigt ist; es ist aber dann ratsam, die Präparate bald nach der Härtung weiter zu verarbeiten. (S. auch Orth'sche Mischung.)

Störend tritt oft bei Formalinhärtung ein feinkörniger, brauner Niederschlag auf, der zu Verwechslung mit Pigmenten führen kann. Er findet sich besonders bei größeren Blutansammlungen, vor allem, wenn schon durch beginnende Fäulnis blutige Imbibition eingetreten war. Man kann ihn durch dünne alkoholische Ammoniaklösung beseitigen; doch leidet dann dabei häufig die Färbung der roten Blutkörperchen. Frei von diesem Nachteil ist nach meinen Erfahrungen Behandlung der Stückchen oder Schnitte mit Schwefelammonium, das man wegen des üblen Geruches gut verschlossen halten muß.

**4) Die Müller'sche Flüssigkeit.** Sie besteht aus

| | | |
|---|---|---|
| Doppeltchromsaurem Kali | 2,5 | Proz., |
| Schwefelsaurem Natron | 1,0 | „ |
| Wasser | 100,0 | „ |

Die vollkommene Härtung in dieser Flüssigkeit erfordert bei gewöhnlicher Temperatur für kleinere Objekte mindestens 12 Wochen, für größere Organe, z. B. ganze Gehirne, aber bis zu einem Jahre. Der Härtungsprozeß kann durch zeitweiliges Einstellen der Präparate in den Brütofen ziemlich beschleunigt werden. Man muß dann aber die Müller'sche Flüssigkeit recht häufig wechseln.

Die Flüssigkeit soll das 10—20-fache der zu härtenden Objekte betragen. Sie wird am 2., 4., 6. und 12. Tage und später jedesmal dann erneuert, wenn sie getrübt ist. Zur Vermeidung von Spaltpilzentwicklung, die sonst leicht eintritt, empfiehlt es sich, der Müller-schen Flüssigkeit Sublimat (1 g auf 2 l Flüssigkeit) zuzusetzen.

Die Präparate können mehrere Jahre, bis zu 10, in Müller'scher Flüssigkeit aufbewahrt werden; doch ist es zweckmäßig, der Flüssigkeit nach Ablauf des 1. Jahres die Hälfte Wasser zuzusetzen.

Zur Nachhärtung, falls eine solche nötig ist, kommen die Präparate, nachdem man sie kurze Zeit bis einige Stunden in oft erneuertem Wasser ausgewässert hat, zunächst für einen Tag in 30-proz. und dann in 96-proz. Spiritus. Wenn sich in diesem letzteren stärkere Niederschläge bilden, so wird er gewechselt. In Spiritus können die Präparate noch mehrere Jahre aufgehoben werden, verlieren aber mit der Zeit an Färbbarkeit.

Die Müller'sche Flüssigkeit wurde früher sehr viel verwendet, da sie vor dem Alkohol manche Vorteile besitzt, wie geringere Schrumpfung, bessere Erhaltung der roten Blutkörperchen, bessere Färbbarkeit der Kerne (aber nur, falls die Präparate hinreichend lange in ihr gelegen haben), geringere Kostspieligkeit. Ihre Nachteile, vor allem die lange Dauer der Fixierung und die geringe antiseptische Kraft lassen sie

jetzt weit weniger in reinem Zustande verwenden. In der Orth'schen Mischung werden ihre Vorteile benutzt, ihre Nachteile vermieden.

Nach der Härtung werden die Stücke gründlich in Wasser ausgewaschen; nur beim Zentralnervensystem unterbleibt dies, da die Chromsalze als Beize für nachfolgende Färbungen dienen.

**5) Orth'sche Mischung (Müller-Formol).** Sie besteht aus 10 Teilen 40-proz. Formols und 100 Teilen Müller'scher Flüssigkeit. Die Mischung ist jedesmal frisch zu bereiten, weil sich am 4. Tage ein kristallinischer Niederschlag bildet. Die Mischung fixiert sehr gut, namentlich auch Kernteilungsfiguren, kleine Stücke im Brütofen schon in 3 Stunden, und ermöglicht ausgezeichnete Färbungen. Von Wichtigkeit ist, daß nach der Härtung sehr sorgfältig ausgewässert wird. Diese Fixierung gestattet auch gut die Anfertigung von Gefrierschnitten.

**6) Erlicki'sche Flüssigkeit.** Dieselbe besteht aus:

| | | |
|---|---|---|
| Doppeltchromsaurem Kali | = | 2,5 |
| Schwefelsaurem Kupfer | = | 0,5 |
| Wasser . | = | 100,0 |

Die Flüssigkeit hat den Vorteil, daß darin Präparate schon in 8—10 Tagen, im Brütofen sogar schon in 4—5 Tagen härten. Sie hat aber den Nachteil gegenüber der Müller'schen Flüssigkeit, daß sie die Schrumpfung der Gewebe nicht so gut verhindert und daß sich in den Präparaten manchmal Niederschläge bilden, die sich aber meist mit warmem oder salzsäurehaltigem Wasser oder in 50-proz. Chromsäure beseitigen lassen.

**7) Sublimat** ist für einzelne Fälle, auf die noch näher eingegangen wird, ein vorzügliches Härtungsmittel. Neben der Härtung bewirkt das Sublimat auch eine Fixation der Kernteilungsfiguren. Man wendet eine in der Wärme gesättigte (7,5-proz.) Lösung von Sublimat in 0,5-proz. Kochsalzlösung an. In dieser Lösung verbleiben die Stücke, die nicht zu dick sein dürfen, 1—2, selten bis zu 6 Stunden. Dann folgt ein gründliches, am besten 24stündiges Auswaschen in Wasser, und schließlich eine Nachhärtung, je 24 Stunden lang in 30-proz., 70-proz. und 90-proz. Alkohol.

Auf das gründliche Auswaschen der Präparate kommt bei der Sublimathärtung viel an, weil sich sonst leicht Quecksilberniederschläge im Präparat bilden, die bei der späteren Untersuchung namentlich zur Verwechslung mit Pigment Veranlassung geben können. Man kann sich übrigens durch Zusatz von einigen Tropfen Jodlösung leicht davon überzeugen, ob in der Auswaschflüssigkeit noch Sublimat gelöst vorhanden ist. Solange dies der Fall ist, bewirkt Jodzusatz einen gelbroten Niederschlag von Quecksilberjodid. Auch hat man empfohlen, dem zur Nachklärung verwandten 70-proz. Alkohol soviel Jodtinktur zuzusetzen, daß derselbe eine weinrote Farbe erhält. Das Jod entfernt dann durch Bildung von Quecksilberjodid das überschüssige Sublimat, und der Alkohol entfärbt sich. Auch aus den einzelnen Schnitten kann man etwaige Sublimatniederschläge durch Jodalkohol entfernen.

Die Sublimathärtung empfiehlt sich im allgemeinen mehr für Objekte, die der Leiche, wie für solche, die dem Lebenden entnommen sind.

**8) Zenker'sche Flüssigkeit.**

Härten dünner Stückchen 24 Stunden lang in einer Mischung von:

| | |
|---|---|
| Sublimat | 5,0 |
| Kali bichromic. | 2,5 |
| Natrium sulfuric. | 1,0 |
| Aqu. destill. | 100,0 |
| Eisessig | 5,0 |

Gründliches Auswaschen in Wasser. Nachhärten in 30-proz. bis 60-proz. bis 96 proz.-Spiritus.

Man kann die nicht kostspielige Flüssigkeit vorrätig halten, nur ist es zweckmäßig, den Eisessig erst kurz vor dem Gebrauch zuzusetzen. Sehr große Stücke verweilen 48 Stunden, kleine nur einige Stunden in der Lösung. Die Reste der etwaigen Sublimatniederschläge kann man, ebenso wie bei der einfachen Sublimathärtung (s. oben) in Jodalkohol entfernen.

Färben kann man mit allen gebräuchlichen Färbemethoden. Die Flüssigkeit dringt sehr leicht in die Organe ein, die anfangs in ihr schwimmen, sie konserviert die chromatischen Figuren viel besser wie Müller'sche Flüssigkeit und gestattet Bakterienfärbung, sowie auch, wenn die Präparate länger, bis zu 14 Tagen, in ihr verweilen, die Weigert'sche Markscheidenfärbung. Auch die Biondi'sche Färbung läßt sich anwenden.

**9) Pikrinsäure** kommt in gesättigter wässeriger Lösung zur Anwendung. Kleine, nicht mehr als 1 cm dicke Stücke verbleiben bis zu 24 Stunden in derselben und werden dann in 70—80-proz. Spiritus übertragen. Es ist bei der Anwendung der Pikrinsäure als Härtungsmittel immer im Auge zu behalten, daß dieselbe auch den Kalk im Knochengewebe und in Verkalkungen auszieht. Die Schnitte der in Pikrinsäure gehärteten Stücke müssen sehr sorgfältig ausgewaschen werden, weil sie sonst Reste der gelben Färbung behalten.

Zur schnelleren und vollständigeren Entfernung von Pikrinsäure empfiehlt Jellinek einen Zusatz von einigen Tropfen gesättigter wässeriger Lithion-carbonicum-Lösung zu dem 95-proz. Spiritus, in welchen das Stück aus der Pikrinsäure übertragen wird. Unter Gelbfärbung des Spiritus löst sich der Niederschlag, der durch den Lithionzusatz entstanden war, und die Flüssigkeit wird vollkommen klar. Man setzt nun so lange einige Tropfen der Lithionlösung zu, bis sich der Niederschlag nicht mehr löst, und der häufiger zu wechselnde Alkohol keine Gelbfärbung mehr aufweist. Dann wird das weiß erscheinende Stück in gewöhnlichen Alkohol übertragen.

**10) Osmiumsäure** muß auch in ihren Gemischen sorgfältig vor Licht und Luft geschützt werden. Sie wird in 1-proz. wässeriger Lösung als Härtungsmittel angewandt. Da die Osmiumsäure sehr schlecht in die Gewebe eindringt, so dürfen die zu härtenden Stückchen nicht mehr als 5 mm dick sein. Sie verbleiben in der Lösung 24 Stunden und werden dann nach 12—24-stündigem Wässern in Spiritus übertragen. Die Osmiumsäure färbt Fetttröpfchen schwarz und ist deshalb, wenn es sich um den Nachweis von solchen handelt, zu empfehlen. Über die Härtung fettig degenerierter Teile s. S. 81.

Die mit Osmiumsäure behandelten Schnitte werden am besten in Kali aceticum (s. S. 11) aufgehoben, weil sich Glyzerin nach und nach

bräunt. Man kann aber das Dunkeln des Glyzerins verhindern, wenn man die Schnitte vor ihrem definitiven Einschluß in demselben einige Tage in mit Wasser verdünntem Glyzerin oder in Wasser liegen läßt.

**11) Flemming's Chromosmiumessigsäuregemisch** kommt häufiger in Anwendung als reine Osmiumsäure, sowohl zur Darstellung der Kernteilungsfiguren, wie zum Studium von Verfettungen.

Bereitung: 2-proz. wässerige Osmiumsäurelösung 4 Teile
1-proz. wässerige Chromsäurelösung 15 „
Eisessig 1 Teil.

Wenn man die Flemming'sche Lösung nicht zur Darstellung der Kernteilungsfiguren, sondern zum Nachweis von Verfettungen benutzt, so ist es oft empfehlenswert, eine geringere Menge Eisessig, 0,3—0,5 zuzusetzen, damit das Protoplasma nicht gar zu durchsichtig wird.

Anwendung:

1) Verweilen der Stückchen in der Fixationsflüssigkeit 1—3 Tage.
2) Auswaschen in Wasser 3—6 Stunden lang.
3) Nachhärtung successive, je einen Tag, in 30-, 60-, 96-proz. Alkohol.
4) In der Regel Celloidineinbettung.

Andere Osmiumsäuregemische, z. B. für die Altmann'sche Darstellung der Zellgranula, und für die Marchi'sche Methode von Degenerationen im Zentralnervensystem sind bei der Beschreibung der betreffenden Methoden angeführt. Über die Einbettung osmierter Präparate von Verfettungen s. bei Nachweis von Fett.

**12) Kochmethode,** ist namentlich dann zu empfehlen, wenn innerhalb der Gewebe befindliche eiweißhaltige Flüssigkeit durch Gerinnenmachen derselben fixiert werden soll, wie das besonders bei Lungenödem, Nephritis und bei Cysteninhalt notwendig werden kann. Man bringt kleine, 1,5 cm dicke Würfel für 1—2—$2^1/_2$ Minuten in kochendes Wasser und härtet in 96-proz. Spiritus nach.

Die Gerinnung und Fixierung eiweißhaltiger Flüssigkeit läßt sich meist auch durch Härtung in absolutem Alkohol schon hinreichend gut bewirken.

## Anhang:

### Herstellung von Sammlungspräparaten in natürlichen Farben.

Da man häufig in die Lage kommt, Präparate, die zu makroskopischen Demonstrationszwecken aufgehoben worden sind, noch nachträglich einer histologischen Untersuchung zu unterziehen, seien die hauptsächlichen zur Konservierung benutzten Methoden kurz angeführt.

Während man früher die Organe oder Geschwülste, die man als makroskopische Präparate aufheben wollte, derart behandelte, daß man in fließendem Wasser das Blut auswusch und sie dann in 70- bis 80-proz. Alkohol, der so oft gewechselt wird, bis keine Trübung mehr entsteht, legte, ist man neuerdings bestrebt, den Präparaten durch Erhaltung ihrer Eigenfarbe, sowie ihrer Blutfärbung ihr natürliches farbiges Aussehen zu konservieren. Im Prinzip beruhen die verschiedenen Verfahren darauf, daß Formollösungen das Oxyhämoglobin in saures Hämatin

umwandeln. In Alkohol geht aus diesem alkalisches Hämatin hervor, das dem unveränderten Blutfarbstoff in der Farbe sehr ähnlich ist.

Nach Melnikow-Raswedenkow bringt man die Organe oder Scheiben von ihnen in folgende Lösung: Natrium aceticum 3 Teile, Kali chloricum 0,5 Teile, Formalin 10 Teile, Wasser 100 Teile. Handelt es sich um größere Organe, so müssen diese nicht nur von der Härtungsflüssigkeit umgeben sein, sondern man muß dieselbe auch in die Gefäße injizieren. Dabei darf man aber nur einen mäßigen Druck anwenden, weil man sonst zuviel Blut aus dem Organe austreiben und dadurch seine natürliche Farbe beeinträchtigen würde. Die Dauer der Einwirkung beträgt bei kleinen Präparaten 1 Tag, bei größeren 2—3—4 Tage. Aus der Formalinlösung, welche mehrmals benutzt werden kann, kommen die Organe in starken Spiritus und dann in eine Lösung von Kali aceticum 30, Glyzerin 60, Wasser 100.

Am meisten benutzt wird das Verfahren von Kaiserling (cf. Virchow's Archiv, Bd. 147, 1897). Danach bringt man die Präparate

1) zunächst für 1—4 Tage in

Lösung I: Formalin 200 ccm
Wasser 1000 ccm
Kalium nitric. 15 g
Kalium acetic. 30 g.

2) Nachbehandlung in Alkohol zwecks Wiederherstellung der Farbe des Blutes.

3) Übertragung in

Lösung II: Wasser 2000 ccm
Kal. acetic. 200 g
Glyzerin 400 g

In letzterer Lösung bleiben die Präparate und werden in Gläsern luftdicht verschlossen. Will man von derart konservierten Objekten mikroskopische Präparate anfertigen, so kann man Scheiben nach gründlicher Wässerung zur Entfernung des Glyzerins auf dem Gefriermikrotom schneiden oder in gewöhnlicher Weise einbetten.

Die Konservierung der Harnsäure erreicht man nach Westenhoeffer, indem man die Harnsäure lösende Formollösung vermeide. Man konserviert zuerst in Formoldämpfen 4—24 Stunden, dann in 80—90-proz. Alkohol, dem auf Watte am Boden etwas Quecksilberoxyd zugesetzt ist und bewahrt die Präparate in Glyzerin auf, dem von Fließpapier oder Watte bedeckt ebenfalls Quecksilberoxyd beigefügt ist; dasselbe bringt man außerdem in ein Beutelchen, allein oder mit Magnesia usta zu gleichen Teilen gemischt.

---

## Viertes Kapitel.

## Die Entkalkung.

Knochen, oder solche Gewebe, die verkalkte oder verknöcherte Partien enthalten, müssen bevor sie schnittfähig sind, von ihren Kalksalzen befreit werden. Dabei sind folgende Regeln zu beachten:

1) Die betreffenden Teile müssen gut gehärtet sein, ehe sie in die Entkalkungsflüssigkeit übertragen werden, weil in dieser die übrigen Gewebe sonst zu sehr verändert werden. Die Härtung geschieht in Alkohol oder noch besser in MÜLLER'scher Flüssigkeit mit nachfolgender Alkoholhärtung. Besonders gut eignet sich auch Formalinhärtung.

Fetthaltige Stücke, z. B. Knochen mit Fettmark müssen erst entfettet werden, da Fett das Eindringen der Säure erschwert und zu störenden Kristallbildungen Veranlassung geben kann.

2) Die Entkalkungsflüssigkeit muß reichlich bemessen sein und muß oft gewechselt und umgeschüttelt werden.

3) Es ist Regel, nicht zu große Stücke zur Entkalkung zu wählen. Man überzeugt sich von der vollständigen Entfernung der Kalksalze durch Einstechen mit einer Präpariernadel oder durch probeweises Einschneiden mit einem Skalpell.

Die Zeit, die bis zur vollständigen Entkalkung nötig ist, ist nicht nur verschieden nach der Konzentration der Entkalkungsflüssigkeit, sondern hängt besonders auch von der Dicke und Größe des zu entkalkenden Objekts ab. Außerdem sind Knochen von Neugeborenen und noch mehr fötale Knochen viel leichter und schneller zu entkalken, als solche von Erwachsenen.

Auch bereits in Celloidin eingebettete Präparate können nachträglich entkalkt werden.

4) Nach vollendeter Entkalkung müssen die Stücke sehr sorgfältig, zwei bis mehrere Tage lang in Wasser ausgewaschen werden, damit keine Reste von Entkalkungsflüssigkeit im Gewebe zurückbleiben und dessen Struktur noch nachträglich schädigen. Man kann das unter anderem in zwei übereinandergestülpten Trichtern bewerkstelligen, von denen der obere etwas enger als der untere und durch einen Gummischlauch mit der Wasserleitung verbunden ist.

Da durch das lange Wässern aber Quellungen hervorgerufen werden können, ist es zweckmäßiger, die Säure chemisch zu entfernen. Man erreicht dies durch 1—2tägiges Einlegen in 5-proz. Lithium- oder Natriumsulfat oder 5-proz. Kalialaunlösung. Danach erst gründliches Auswässern.

5) Die so von der Säure befreiten Präparate können gelegentlich mit dem Gefriermikrotom geschnitten werden. Im allgemeinen ist Alkoholhärtung und Celloidineinbettung vorzuziehen.

Die am häufigsten angewandten Entkalkungsflüssigkeiten sind folgende:

## I. Salpetersäure und ihre Gemische.

1) Wässerige Salpetersäure ist in 3—10-proz. Verdünnung zur Entkalkung geeignet (die offizinelle Salpetersäure ist 30-proz.). Die einfach wässerigen Lösungen verändern die Strukturverhältnisse weniger, wie die entsprechenden Salzsäurelösungen und sind sehr empfehlenswert. Alle Zusätze verzögern die entkalkende Wirkung.

2) Formalin-Salpetersäure ist sehr empfehlenswert. Die Präparate werden in Formalin gehärtet und in Spiritus nachbehandelt. Dann kommen sie in eine 10-proz. Formalinlösung, der 10 Proz. Salpetersäure zugesetzt sind.

Die Formalin-Salpetersäuremethode ist auch bei Präparaten anwendbar, die in anderen Flüssigkeiten, z. B. Alkohol oder Müller-scher Flüssigkeit gehärtet sind.

3) Phloroglucinmethode. Das Phloroglucin wirkt nicht selbst entkalkend, sondern soll nur die Gewebe vor der gleichzeitig anzuwendenden Säure schützen. Dabei kann die Säure in so starken Konzentrationen einwirken, daß die Entkalkung bei kleinen Knochenstücken schon nach einer halben, bei härterem Knochenmaterial manchmal schon nach einigen Stunden vollendet ist. Es ist deshalb nötig, bei Anwendung dieser Methode das Präparat fortwährend zu kontrollieren.

Die Lösung wird in folgender Weise hergestellt:

Phloroglucin 1,0 wird in reiner, nicht rauchender Salpetersäure 10,0 unter vorsichtigem Erwärmen gelöst, am besten unter dem Abzug des chemischen Herdes, da bei der Mischung unter stürmischer Entwicklung braunroter Dämpfe von salpetriger Säure eine bedeutende Wärmeentwicklung eintritt. Nach Scheffer ist die Erwärmung der Salpetersäure überhaupt entbehrlich.

Zu dieser (rubinroten) Stammlösung werden hinzugesetzt 10-proz. wässerige Salpetersäurelösung 100 ccm.

Will man größere Mengen von Entkalkungsflüssigkeit verwenden, so muß man auch größere Mengen von Stammflüssigkeit frisch bereiten.

Eine etwas langsamer wirkende Entkalkungsflüssigkeit ist die folgende:

| | |
|---|---|
| Phloroglucin | 1,0 |
| Acid. nitric. | 5,0 |
| Alhohol | 70,0 |
| Aqu. destillata | 30,0 |

4) Alkoholische Lösung. Um die durch das lange Verweilen in wässeriger Lösung bedingte Aufquellung zu vermeiden, empfiehlt Haug folgende alkoholische Lösung:

| | |
|---|---|
| Acidum nitricum purum | 30,0—90,0 |
| Alkohol absolut. | 700,0 |
| Aqu. destillata | 300,0 |
| Chlornatrium | 2,5. |

Diese Lösung entkalkt schnell und doch schonend. Sie eignet sich sowohl für fötalen, wie für jugendlichen und erwachsenen Knochen. Besonders empfehlenswert ist vorherige Fixierung der Objekte in Sublimat, doch bleibt auch nach allen anderen Härtungsmethoden die Färbbarkeit sehr gut erhalten.

5) Alkoholische Lösung von Thoma. Die Methode gestaltet sich folgendermaßen:

a) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit oder in Alkohol.

b) Entkalkung in einer öfter zu wechselnden Lösung
von 96-proz. Spiritus 5 Raumteile,
offizinelle, reine konzentrierte Salpetersäure, 1 Raumteil.

c) Abspülen in Spiritus.

d) Übertragen in häufiger zu wechselnden Spiritus, dem präzipitierter kohlensaurer Kalk im Überschuß zugesetzt ist.

Die Entkalkung ist in 2—3 Wochen auch bei größeren Stücken vollendet. Um das Anhaften von Kalkpulver zu vermeiden, umhüllt

man die Stücke passenderweise mit Fließpapier. Die Entsäuerung in kalkhaltigem Spiritus dauert im ganzen 8—14 Tage. Sie ist auch noch einige Tage lang fortzusetzen, nachdem durch Lakmuspapier schon keine Säure mehr angezeigt wird.

### II. Salzsäure.

Einfach wässerige Lösungen werden nicht angewendet, da sie zu starke Quellung verursachen, sowie Struktur und Färbbarkeit schädigen. Von Mischungen sind erwähnenswert:

1) von Ebner verwendet als quellungshinderndes Mittel eine 10 bis 15-proz. Kochsalzlösung, der er 1—3 Proz. Salzsäure zusetzt. Die Säure muß der Größe des Knochenstücks entsprechen und oft erneuert werden. Die Entsäuerung wird am besten in häufig gewechselter und umgeschüttelter 10—15-proz. Kochsalzlösung vorgenommen.

2) Alkoholische Kochsalzsäuremischung.

| | |
|---|---|
| Salzsäure | 2,5 |
| Alkohol (96-proz.) | 500,0 |
| Aqu. dest. | 100,0 |
| Chlornatrium | 2,5. |

Man kann die Entkalkung dadurch beschleunigen, daß man den Säurezusatz bis auf 5 Proz., zugleich aber auch in entsprechendem Maße den Kochsalzgehalt steigert.

3) Waldeyer empfiehlt folgende Chlorpalladiumlösung:

| | |
|---|---|
| Palladiumchlorid | 0,01 |
| 1-proz. Salzsäurelösung | 1000,0. |

Nach gründlichem Auswaschen wird successive in 30-proz., 60-proz. und 90-proz. Spiritus nachgehärtet.

Auch Lösungen von Salzsäure in Formalin werden angewandt.

### III. Die Chromsäure und ihre Salze.

Eine geringe entkalkende Wirkung besitzt schon die Müller'sche Flüssigkeit, jedoch nur bei kleinen Knochenstückchen oder bei embryonalen Knochen. Für andere Objekte ist die zur Entkalkung erforderliche Zeit dagegen fast immer eine zu lange. Eine Beschleunigung kann man nach Haug erzielen, wenn man bei dem jedesmaligen Wechsel der Flüssigkeit alle 3—5—8 Tage, je 1 ccm Salpetersäure auf 200 bis 300 ccm Flüssigkeit zusetzt. Ein Vorteil der Müller'schen Flüssigkeit ist die gute Konservierung der Gewebe.

Auch die reine Chromsäure in 2-proz. Lösung wirkt langsam entkalkend; eine etwas schnellere Wirkung erzielt man, wenn man ein Gemisch verwendet von

| | |
|---|---|
| Chromsäure | 1,0 |
| Salzsäure | 1,0 |
| Wasser | 100,0. |

Die Resultate sind nach Haug besonders bei jungen Knochen sehr gute.

Für zarte und kleine Objekte ist auch die Flemming'sche Lösung sehr zu empfehlen.

Waldeyer empfiehlt folgende Chromsäuremethode:

1) Fixierung des frischen Objekts in Chromsäure 1 : 600.

2) Härtung in Chromsäure 1 : 400, später 1 : 200.

3) Entkalkung in einer alle 6 Tage zu wechselnden Mischung von
Chromsäure (1 : 200) 100 ccm
Reine Salpetersäure 2 „

Gründliches Auswaschen. Nachhärtung in Alkohol.

Die Dauer der Entkalkung beträgt ein Vierteljahr und mehr.

Die Fol'sche Entkalkungsflüssigkeit hat folgende Zusammensetzung:

Chromsäure (1 Proz.) = 70 Teile
Salpetersäure = 3 „
Wasser = 200 „

Für sehr zarte Objekte empfiehlt Haug folgende Entkalkungsflüssigkeit:

1-proz. Osmiumsäure 10 ccm
1-proz. Chromsäure 25 „
Aq. destillata 65 „

Auswaschen in Wasser. Nachhärten in 70-proz. Alkohol.

**IV. Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung.**

Man wendet am besten eine wässerige Lösung an, welche Pikrinsäure im Überschuß enthält. Dieselbe wirkt zugleich härtend, fixierend und färbend.

Die Tibia eines Neugeborenen, unzerschnitten eingelegt, ist in etwa 3 Wochen entkalkt. Bei größeren und älteren Knochen beträgt die Dauer bis zu mehreren Monaten. Eine Beschleunigung kann man erreichen, wenn man 3—5-proz. Salpetersäure zusetzt. Verbindungen mit Schwefelsäure sind dagegen nicht statthaft, weil sich dabei die fast unlöslichen schwefelsauren Kalksalze bilden.

**V. Milchsäure, in 10-proz. und stärkeren Lösungen.**

Dieselbe entkalkt ziemlich viel schneller, wie Pikrinsäure, und greift dabei die Gewebe nur wenig an.

**VI. Holzessig** (Acidum pyrolignosum purum).

Derselbe wird in unverdünntem Zustande von Haug namentlich empfohlen für fötales Knochengewebe, für solches von niederen Tieren, sowie für Knochen- und Knorpelknochengeschwülste. Er wirkt zugleich etwas erhärtend. Für erwachsene Knochen eignet er sich nicht besonders.

**VII. Trichloressigsäure** (Acidum trichloraceticum).

Diese Methode gibt sehr gute Resultate, da sie rasch wirkt und die Gewebestruktur in ausgezeichneter Weise schont. Härtung in Alkohol, Formol oder Müller'scher Flüssigkeit. Dann werden die Stücke je nach Größe und Kalkgehalt für 1—7 Tage in häufig geschüttelte und gewechselte 5-proz. wässerige Trichloressigsäurelösung gebracht. Entsäuern 1—2 Tage in fließendem Wasser. Nachhärtung in steigendem Alkohol.

Fünftes Kapitel.

# Injektionsverfahren.

Zur besseren Sichtbarmachung von Blutgefäßen, namentlich des unter gewöhnlichen Verhältnissen wenig hervortretenden Kapillarsystems, dann auch von Lymphgefäßen, von Drüsenkanälen mit ihren Verzweigungen usw. bedient man sich der Injektionsmethode, d. h. der künstlichen Füllung der betreffenden Hohlräume mit einer Farbstofflösung; es kommt aber das Injektionsverfahren für die pathologische Histologie nicht so häufig zur Anwendung, wie für die normale. Genauere Angaben s. Encyklopädie der mikr. Technik „Injektion der Blut- und Lymphgefäße".

Hauptbedingung ist, daß die Farbflüssigkeit nicht unter zu hohem Druck eingetrieben wird, weil sonst leicht die Gefäßwände reißen und so künstliche Extravasate entstehen; außerdem muß der Druck ein möglichst konstanter sein. Bei hinreichender Übung kann man auch bei Anwendung der gewöhnlichen Spritzen erheblichere Druckschwankungen vermeiden. Das Verfahren ist aber ein etwas langwieriges. Die Spritze muß sorgfältig gearbeitet sein und der Stempel sich leicht hin und her bewegen lassen. Zwischen dem Ansatzstück der Spritze und der in das Gefäß einzuführenden Kanüle muß eine Abschlußvorrichtung vorhanden sein, damit man beim Ab- und Ansetzen der Spritze behufs neuer Füllung nicht in Gefahr kommt, Luftblasen mit zu injizieren. Außerdem ist es gut, wenn man Kanülen von verschiedenem Durchmesser besitzt. Dieselben werden in den Anfangsteil des Gefäßes eingebunden, und die Injektion so lange fortgesetzt, bis eine hinreichend intensive Färbung erreicht ist, oder bis die Injektionsflüssigkeit aus der Vene eine Zeitlang abgeflossen ist.

Sehr häufig ereignet es sich, daß schon im Anfang der Injektion die Flüssigkeit aus oberflächlich verletzten Gefäßen, namentlich auch aus den Kapselvenen (Niere) abfließt. Derartige Gefäße schließt man, wenn die austretende Flüssigkeit reichlicher ist, durch Schieberpinzetten oder Serres fines.

Einen Apparat zum Injizieren unter konstantem, nach Belieben zu steigerndem oder zu verminderndem Druck kann man sich, wenn man eine Wasserleitung zur Verfügung hat, mittels zweier Flaschen leicht herstellen. Die erste dieser Flaschen, A, die luftdicht verschlossen ist, steht vermittelst eines bis auf den Boden reichenden Glasrohres und eines sich daran ansetzenden Schlauches mit dem Hahne einer Wasserleitung in Verbindung. Außerdem führt von dieser Flasche ein zweites, winklig gebogenes Glasrohr in die mit einem doppelt durchbohrten Stöpsel versehene zweite Flasche B, in die es ziemlich dicht unter dem Stöpsel einmündet. Die Flasche B ist dann ganz ähnlich wie die gewöhnlichen Spritzflaschen mit einem zweiten ebenfalls gebogenen, bis auf den Boden reichenden Glasrohr versehen, an dessen Ausmündungsstelle ein Gummischlauch mit der betreffenden Kanüle angebracht ist.

Füllt man nun die zweite Flasche B mit der Injektionsflüssigkeit und läßt in der Flasche A ein gewisses Quantum Wasser von der Leitung laufen, so drückt die dadurch in A komprimierte Luft in der Flasche B auf die Injektionsflüssigkeit und bringt diese zum Ausfließen.

Kann man die Wasserleitung nicht benutzen, so muß dieselbe durch eine dritte Flasche C ersetzt werden, welche höher steht und welche mit Wasser oder mit Quecksilber gefüllt ist. Die dritte Flasche C ist dann mit der Flasche A durch einen mittels Quetschhahn verschließbaren Gummischlauch verbunden. Öffnet man diesen Quetschhahn, so fließt ein beliebig zu normierendes Quantum Wasser, resp. Quecksilber in die Flasche A und wirkt dann, indem in dieser die Luft komprimiert wird, in derselben Weise wie die Wasserleitung.

Es ist selbstverständlich, daß die Flasche C, wenn sie mit Wasser gefüllt ist, viel höher stehen muß, als wenn sie Quecksilber enthält.

Es sind nun sog. kaltflüssige Injektionsmassen im Gebrauch, bei denen der Farbstoff in Wasser oder Glyzerin suspendiert ist, und warmflüssige Injektionsmassen, die einen Zusatz von Leim enthalten und daher nur in der Wärme flüssig sind, während sie bei gewöhnlicher Temperatur erstarren.

Die letzteren geben bessere Resultate, das Verfahren ist aber umständlicher, weil sowohl die Injektionsmasse, wie das zu injizierende Organ auf 40—50 ° gehalten werden müssen. Das letztere bringt man am besten in Wasser von der eben genannten Temperatur.

Von den zahlreichen Injektionsmassen, die empfohlen worden sind, seien hier nur die folgenden angeführt:

## A. Kaltflüssige Massen.

1) Lösliches Berliner Blau 1,0
Aqua destillata 20,0.

2) Injektionsflüssigkeit von Cohnheim.
Anilinblau 1,0
0,5-proz. Kochsalzlösung 600,0.

3) Kollmann's kaltflüssige Karmininjektion.

1 g Karmin wird in wenig Wasser mit 15 Tropfen konzentriertem Ammoniak gelöst und mit 20 ccm Glyzerin verdünnt.

Dazu setzt man eine Mischung von Glyzerin 30 und Kochsalz 1 g. Das Ganze wird dann mit der gleichen Menge Wasser verdünnt.

4) Tandler's kaltflüssige Gelatinemasse.

5 g möglichst salzfreier, feiner Gelatine werden in 100 g destillierten Wassers zum Quellen gebracht und dann geschmolzen. Zu derselben wird Berliner Blau und dann vorsichtig 5—6 g Jodkalium hinzugefügt; die Masse bleibt bis zu einer Temperatur von 17 ° dünnflüssig. Dieselbe kann mit einigen Thymolkristallen versehen in einem Stöpselglase monatelang aufbewahrt werden. Die injizierten Objekte werden in 5-proz. Formollösung fixiert und die so fixierte Gelatine ist absolut „säure- und basenfest", so daß man die injizierten Organe auch der Entkalkung aussetzen kann.

Organe, die mit kaltflüssiger Injektionsmasse injiziert sind, werden direkt in Spiritus oder Formalin gebracht und hier nach einigen Stunden in nicht zu kleine Stücke zerschnitten.

## B. Warmflüssige Massen.

5) Leimmasse und Berliner Blau nach Thiersch; man bereitet sich:

A) eine kaltgesättigte Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydul;
B) eine kaltgesättigte Lösung von rotem Blutlaugensalz;
C) eine gesättigte Lösung von Oxalsäure;
D) eine Lösung von Leim im Verhältnis 2 : 1.

Es werden zunächst 15 g von D mit 6 ccm von A in einer ersten Porzellanschale vermischt. Dann werden in einer zweiten Schale 30 g von D mit 15 ccm von B vermischt, und dann noch 12 ccm von C hinzugefügt.

Nun wird, nachdem die Massen in beiden Schalen auf 30 ° abgekühlt sind, der Inhalt der ersten Schale tropfenweise und unter beständigem Umrühren zu dem in der zweiten Schale gegeben. Dann wird die ganze intensiv blau gefärbte Masse auf 70—100 ° erhitzt und in einem Heißwassertrichter durch Flanell filtriert.

6) Leimmasse und Karmin nach Frey.

Man halte sich eine Ammoniaklösung und eine solche von Essigsäure bereit, von welchen man die zur Neutralisation erforderlichen Tropfenzahlen vorher bestimmt hat.

Etwa 2—2,5 g feinsten Karmins werden mit einer abgezählten Tropfenmenge der Ammoniaklösung (welche man nach Belieben größer oder geringer nehmen kann), und etwa 15 ccm destillierten Wassers in einer Schale unter Reiben gelöst und filtriert, wozu einige Stunden erforderlich sind, und wobei durch Verflüchtignng ein Ammoniakverlust erfolgt.

In eine filtrierte, mäßig erwärmte, konzentrierte Lösung feinen Leims wird die ammoniakalische Karminsolution unter Umrühren eingetragen, etwas auf dem Wasserbad erwärmt, und darauf die zur Neutralisation der ursprünglich benutzten Ammoniaklösung erforderliche Tropfenzahl langsam und unter beständigem Umrühren hinzugegeben. Man erhält so die Ausfällung des Karmins in saurer Leimlösung.

Will man schneller zum Ziele kommen, so löse man das Karmin in Ammoniak, setze den gelösten Farbstoff der heißen Gelatine zu, fälle durch Essigsäure und filtriere das Ganze erst hinterher durch Flanell.|

Hat man eine Leiminjektionsmasse angewandt, so bringt man das Organ nach vollendeter Injektion in kaltes Wasser, um das Erstarren der Injektionsmasse zu beschleunigen, von da wird es in 80-proz. Spiritus übertragen.

Zu bemerken ist noch, daß man fertige gute kalt- und warmflüssige Injektionsmassen von Dr. Grübler u. Co., Leipzig, beziehen kann.

### C. Milchinjektion nach B. Fischer.

Bedeutend einfacher, rascher zum Ziele führend und für viele Zwecke ausreichend ist das neuerdings von Fischer (Zentralblatt für Pathologie 1902, Nr. 24) angegebene Verfahren von Milchinjektion mit nachfolgender Fettfärbung. Das Organ wird zuerst durch Ausspülen mit gut filtrierter 8-proz. Natriumnitrat- oder Natriumsulfatlösung von Blut befreit, dann mit Milch injiziert. Durch 24stündige Fixierung in Wasser 1000,0, 40-proz. Formol 75,0, reine Essigsäure 15,0 gerinnt die Milch und man kann dann Stückchen dem Gefrierverfahren und Sudanfärbung oder der Osmierung unterwerfen.

### D. Injektion der feinen Lymphgefäße.

Erwähnung verdient noch die Injektion der Lymphgefäße durch die Einstichmethode. Eine feine Kanüle wird vorsichtig an der betreffenden Stelle eingestochen, und zwar oft am zweckmäßigsten durch eine Gefäßwand hindurch, in deren Umgebung hinein. Dann werden unter sehr vorsichtigem Druck die so getroffenen Lymphspalten und Lymphgefäße injiziert.

Beitzke injiziert mittels ganz fein ausgezogener Glaskapillaren, die an die Spritze angedichtet sind, folgende Mischung

3 Teile Preußisch Blau

5 Teile Terpentinöl werden gut verrieben, dann 15 Teile Äther zugesetzt; das Ganze durch Putzleder filtriert.

### E. Physiologische Injektion.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Methoden wird hier der Farbstoff dem lebenden Tiere einverleibt und durch die Zirkulation den verschiedenen Organen zugeführt. Sehr bald ist der Farbstoff auch in den Parenchymzellen und in den Drüsenkanälchen der Niere, Leber, Speicheldrüsen usw. nachweisbar. Die sichersten Resultate erhält man mit indigschwefelsaurem Natron, das von Verunreinigungen frei sein muß. Man kann den Farbstoff subkutan in Substanz oder Lösung, intraperitoneal oder intravenös als konzentrierte wässerige Lösung injizieren. Man tötet die Tiere nach 1—3 Stunden und fixiert die Organe in absolutem Alkohol.

Über die Ehrlich'sche „vitale Methylenblauinjektion" s. bei Nervensystem. Über Injektion von Lithionkarmin s. S. 14.

---

## Sechstes Kapitel.

# Einbettungsmethoden.

Die Einbettungsmethoden haben einmal den Zweck, Präparate, die auch bei sorgfältiger Härtung nur eine mäßige Festigkeit erlangen, schnittfähig zu machen; daneben sind aber manche Einbettungsmassen, die bei der Färbung und Untersuchung nicht aus den Schnitten entfernt zu werden brauchen, befähigt, einzelne Gewebsbestandteile oder

abnormen Inhalt zu fixieren, so daß bei den verschiedenen Manipulationen, denen der Schnitt ausgesetzt wird, nichts ausfällt. Ferner ist für Anfertigung von Serienschnitten eine Einbettung unumgänglich.

## I. Celloidineinbettung.

Sie hat den Vorteil, daß alle Manipulationen bei Zimmertemperatur, also ohne Paraffinofen vorgenommen werden können, ferner daß die Einbettungsmasse durchsichtig ist, die meisten Farben wieder abgibt und daher aus den Schnitten in der Regel nicht wieder entfernt zu werden braucht. Auch ist kein anderes Verfahren zur Herstellung so großer Schnitte geeignet. Als Nachteile stehen der Paraffineinbettung gegenüber, daß die ganze Prozedur länger dauert und nicht so beschleunigt werden kann, und daß sich die für manche Untersuchungen nötigen ganz dünnen Schnitte (unter 10 $\mu$) nur schwer herstellen lassen.

Man stellt sich eine dünnflüssige und eine dickflüssige Celloidinlösung her, letztere von der Konsistenz dicken Sirups, indem man das in ganz kleine Stückchen zerschnittene Tafelcelloidin (Chem. Fabrik vormals Schering, Berlin) trocknet und in Alkohol-Äther zu gleichen Teilen löst. Ganz zweckmäßig ist es, die Celloidinstückchen in einem Gazebeutel in Alkohol-Äther hineinzuhängen, bis die gewünschte Konsistenz erreicht ist. Die Lösung geht am schnellsten vor sich, wenn man das Celloidin zunächst in absolutem Alkohol aufquellen läßt und dann erst den Äther hinzufügt.

Die Präparate müssen vorher in absolutem Alkohol vollkommen entwässert sein. Dann bringt man sie für 24 Stunden in Alkohol-Äther und daraus kommen die Stückchen, die nicht dicker als 1 cm sein sollen, zunächst für mindestens 24 Stunden in die dünne und dann ebenso lange in die dicke Celloidinlösung. Wenn es sich um schwieriger zu behandelnde Objekte handelt, sowie in allen Fällen, in denen die Zeit nicht drängt, empfiehlt es sich, den Aufenthalt der Stücke in beiden Celloidinlösungen auf mehrere Tage zu verlängern, da die Einbettung um so besser gelingt, je länger und je mehr die Präparate von den beiden Celloidinlösungen durchtränkt worden sind.

In der dickflüssigen Celloidinlösung werden die Präparate durch Erstarren zu größerer Konsistenz gebracht. Je langsamer das Celloidin trocknet, desto gleichmäßiger und fester wird das Präparat. Man wird daher nur in sehr dringenden Fällen das Erstarren an der freien Luft vornehmen. Besser ist es, unter einer Glasglocke oder in einer großen Doppelschale die Verdunstung eintreten zu lassen, wobei man durch Zwischenlegen von Papier u. dergl. die Luftzufuhr etwas beschleunigen kann. Sehr empfehlenswert ist das Erstarrenlassen des Celloidins in einer Chloroformatmosphäre, die man durch einen getränkten Wattebausch oder ein offenes Schälchen mit Chloroform erreicht; dadurch wird die Konsistenz besonders gleichmäßig.

Man kann das Präparat in einem Schälchen mit dicker Celloidinlösung langsam erstarren lassen. Ist die Konsistenz so fest, daß man eben noch mit dem Nagel eindrücken kann, bringt man die ganze Celloidinmasse in 76—80-proz. Spiritus, schneidet später das Objekt in geeigneter Weise heraus und klebt es mit Leim auf einen in die Mikrotomklammer passenden Holzblock.

Häufiger wird folgendes Verfahren angewandt: Man bringt das Objekt aus der dicken Celloidinlösung auf einen Präparatenklotz, orientiert es nach der gewünschten Schnittrichtung (eventuell unter provisorischer Zuhilfenahme von Stecknadeln) und übergießt es mit derselben dicken Celloidinlösung. Man kann das seitliche Abfließen durch eine später zu entfernende Papiermanschette um den Block verhindern. Das Erstarrenlassen erfolgt dann nach den oben angeführten Regeln.

Als Präparatenklotz ist der oft verwendete Kork nicht empfehlenswert, da er bei der Aufbewahrung in Spiritus ausgelaugt wird und die Färbbarkeit bald schädigt. Besser sind Holzklötze; doch wird auch ihnen durch den Alkohol Gerbsäure entzogen, am wenigsten dem Pappelholz. Deshalb ist es zweckmäßig, die Holzklötze mehrere Stunden lang in 2-proz. Sodalösung zu kochen und in öfter erneuertem Spiritus aufzubewahren. Vor dem Aufkleben des Präparates müssen die Klötze natürlich sorgfältig getrocknet werden.

Wegen seiner chemischen Indifferenz empfiehlt Jelinek zum Aufkleben Stabilit, welcher in Wasser und Alkohol unlöslich, und selbst von Salzsäure, verdünnter Schwefelsäure und Ätzkali nicht angegriffen wird. Stabilit ist in Plattenform von der Berliner Elektrizitätsgesellschaft zu beziehen und läßt sich mit der Säge leicht zerteilen, und durch Behandeln mit Schmirgelpapier und nachfolgendes Abreiben mit einem trockenen Tuch glatt polieren. In Wasser geht Stabilit unter.

Es kommen auch sehr empfehlenswerte, durch Längs- und Querriefen gerauhte Platten in den Handel, die in beliebiger Größe dem in die Präparatenklammer des Mikrotoms passenden Fußstück aufsitzen.

Alle Celloidinpräparate werden nach dem Erstarren an der Luft für 12—24 Stunden in 70—80-proz. Spiritus nachgehärtet; erst dadurch erlangen sie die zum Schneiden geeignete Konsistenz. So können sie längere Zeit aufgehoben werden, wenn der Spiritus von Zeit zu Zeit erneuert wird.

Die Einbettung läßt sich bedeutend beschleunigen, wenn die Fixierung und Entwässerung der Gewebsstückchen in Aceton vorgenommen wird, aus dem sie direkt in die dünne Celloidinlösung übertragen werden können.

Die Celloidineinbettung zerfällt also in folgende Manipulationen:

1) Härtung oder Nachhärtung in absolutem Alkohol,
2) 24 Stunden in Alkohol-Äther,
3) 1—5tägiges Verweilen in dünnflüssigem Celloidin.
4) 1—5tägiges Verweilen in dickflüssigem Celloidin.
5) Erstarrenlassen in Schälchen oder auf Präparatenklotz unter Glasglocke.
6) 24 Stunden in 80-proz. Spiritus.
7) Schneiden oder Aufbewahren in 80-proz. Spiritus.

## II. Einbettung in Paraffin.

Außer größerer Schnelligkeit und größerer Schnittdünne ist Paraffineinbettung auch für Serienschnitte, sowie für durchgefärbte Stückchen von Vorteil. Die Schrumpfung ist im ganzen stärker als bei Celloidineinbettung, aber bei guter Technik nicht störend. Nur manche Objekte gewinnen eine sehr harte, spröde Konsistenz, die das Schneiden erschwert.

Man benötigt zur Einbettung Paraffinsorten von verschiedenen Schmelzpunkten, z. B. ein weiches von 45° und ein hartes von 56°; durch Mischen der beiden Sorten lassen sich alle Zwischenstufen herstellen. Ferner muß man einen Thermostaten mit Thermoregulator besitzen, der etwas über der Schmelztemperatur des Paraffins eingestellt wird, also etwa auf 56—58°. Im allgemeinen bevorzugt man härteres Paraffin, je dünner die Schnitte werden sollen, und je höher die Außentemperatur, z. B. im Sommer, ist.

Das gemeinsame Grundprinzip aller im einzelnen etwas verschiedenen Paraffineinbettungsmethoden ist folgendes: Nach beliebiger Fixierung muß eine gründliche Entwässerung in Alkohol von steigender Konzentration vorgenommen werden. Aus dem absoluten Alkohol kommen die Stückchen in ein Lösungsmittel des Paraffins, das sich anderseits auch gut mit Alkohol mischt; als solches hat sich neben ätherischen Ölen und Chloroform hauptsächlich Xylol und Toluol bewährt. Der Aufenthalt in Xylol darf nicht zu lange bemessen werden, da die Stückchen sonst leicht zu hart und spröde werden, im Mittel 2—4 Stunden. Nun werden sie zunächst in eine Mischung dieses Lösungsmittels mit Paraffin für 2—3 Stunden gebracht, was ganz zweckmäßig in gelinder Wärme, etwa auf dem Paraffinofen geschieht; sodann kommen sie in das Paraffin von dem gewünschten Schmelzpunkt, das man am besten einmal wechselt. Nachdem sich die Stücke hier in 3—4 Stunden mit dem flüssigen Paraffin durchtränkt haben, wird dasselbe in ein aus Kartonpapier oder durch Aneinanderschieben von zwei rechteckigen Metallrahmen auf einer Glasplatte hergestelltes Kästchen ausgegossen, dessen Wände man mit Glyzerin bestreicht, und das Präparat darin in der gewünschten Lage fixiert. Die Lage des Präparats muß man sich genau merken, da man sich an dem nach dem Erstarren undurchsichtigen Paraffinblock nicht mehr orientieren kann. Das Erstarren des Paraffins wird durch Umgießen mit kaltem Wasser möglichst beschleunigt; wenn erst die oberflächlichste Paraffinschicht etwas erhärtet ist, kann man das ganze Präparat untertauchen. Je schneller die Erstarrung des Paraffins vor sich geht, desto gleichmäßiger und besser schneidbar ist die Konsistenz. Der etwa in $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde erhärtete Paraffinblock wird zurechtgeschnitten und entweder direkt in die Klammer des Mikrotoms eingeklemmt oder auf einen Holzblock aufgeschmolzen und — ohne das Messer zu befeuchten — meist mit querer Messerstellung geschnitten.

Demnach zerfällt das Verfahren der Paraffineinbettung in folgende Maßnahmen:

1) Härtung oder Nachhärtung und Entwässerung in absolutem Alkohol.

2) 2—4 Stunden in Xylol oder Toluol.

3) 2—3 Stunden in eine Mischung von Xylol und Paraffin.

4) 2—3 Stunden bei 50° im Wärmekasten in flüssiges eventuell einmal zu wechselndes Paraffin.

5) Ausgießen und Erstarren.

6) Schneiden.

Andere Übergangsmedien (auch Vorharze genannt) werden für besondere Zwecke verwandt, z. B. um die Einbettung zu beschleunigen (siehe Schnelleinbettungen) oder um ein Sprödewerden der Objekte zu

vermeiden. Dafür ist ein Verweilen der Objekte vor der Xylolbehandlung in Zedernholzöl für 24 Stunden oder länger empfehlenswert.

Heidenhain rühmt dem Schwefelkohlenstoff als Übergangsmedium große Vorteile nach; die Durchtränkung soll sehr gleichmäßig sein, der Aufenthalt in der hohen Temperatur wird bedeutend abgekürzt. Er empfiehlt folgenden Einbettungsgang: 1) aus dem Alkohol absolutus in eine Mischung von Alkohol und Schwefelkohlenstoff zu gleichen Teilen, 2) reinen Schwefelkohlenstoff, 3) desgleichen wiederholt, 4) gesättigte Lösung von 55° Paraffin in Schwefelkohlenstoff bei 30° (auf dem Thermostaten von 36°), 5) analoge Lösung bei 40—42° gesättigt (auf einem Thermostaten von 55—57°), 6) reines Paraffin, einmal gewechselt $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunde. Vorsicht erheischt die Feuergefährlichkeit des Schwefelkohlenstoffs. Vor dem schlechten Geruch schützt man sich durch gut schließende Gefäße und Vermeiden von Umschütteln usw.

Plecnik (Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 1902, p. 328) empfiehlt den nicht feuergefährlichen Tetrachlorkohlenstoff.

Bei osmierten Präparaten vermeidet man besser das Xylol und ersetzt es durch Chloroform, reines Benzin oder Petroläther, die übrige Behandlung ist dieselbe.

Mit Vorteil kann man auch von der entwässernden und gut eindringenden Kraft des Anilinöls und Acetons Gebrauch machen, besonders für die

## Schnelleinbettungen.

I. Nach Lubarsch.

1) Die frischen Gewebsstücke, deren Dickendurchmesser $^1/_2$ cm nicht überschreiten soll, werden in ein weites Reagenzglas getan und auf 10—15 Minuten in den Paraffinofen von 50—53° gebracht. Die Flüssigkeit wird während dieser Zeit 1—2 mal gewechselt.

2) Übertragen in 90—95-proz. Alkohol auf 5—10 Minuten. Einmaliges Wechseln der Flüssigkeit.

3) Die Stücke gelangen in absoluten Alkohol auf 10 Minuten. Zweimaliges Wechseln der Flüssigkeit.

4) Belassen in ganz klarem Anilinöl, bis die Stücke völlig durchsichtig, was je nach der Größe in 10—30 Minuten erreicht zu sein pflegt.

5) Entfernen des Anilinöls durch Xylol. Wechseln des letzteren, bis es nicht mehr gelb wird (2—3 mal). Meist in 10—20 Minuten vollendet.

6) Einbetten in Paraffin 10 Minuten bis 1 Stunde. Alle Prozeduren werden im Paraffinofen von 50—53° vorgenommen. In 1—3 Stunden kann die Einbettung vollendet sein.

II. Nach Henke und Zeller.

1) Die frischen Gewebsstückchen werden unmittelbar in ca. das 25fache Volumen reinen Acetons in ein gut schließendes Gefäß gebracht. Das gebrauchte Aceton ist öfters verwendbar, wenn man es durch ausgeglühtes Kupfersulfat wieder wasserfrei macht. Meist genügt eine Härtungsdauer von $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden.

2) Nach vollendeter Härtung kommen die Stückchen direkt in das flüssige Paraffin von 52—56° Schmelzpunkt in den Paraffinofen. Da der Siedepunkt des Acetons bei 56° liegt, verdampft dabei ein Teil des Acetons, was sich durch Blasenbildung bemerkbar macht. Die Zeitdauer des Verweilens in flüssigem Paraffin beträgt $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden.

## Kombinierte Celloidinparaffinmethode.

Durch Kombination der Celloidin- und der Paraffineinbettung erhält man oft eine sehr gute Schnittfähigkeit der Präparate, so daß sich große und dabei doch hinreichend dünne Schnitte erzielen lassen.

Das Verfahren ist folgendes:

1) Übertragen des Objekts aus dem Alkohol in eine Mischung von absolutem Alkohol und Äther zu gleichen Teilen, für einige Stunden.

2) Durchtränkung in mäßig dicker Celloidinlösung 24 Stunden lang.

3) Übertragen in Ol. Origani.

4) Übertragen in eine Mischung von Paraffin und Ol. Origani, welche bis auf höchstens 40° erwärmt ist.

5) Übertragen in geschmolzenes Paraffin.

Die weitere Behandlung wie bei der gewöhnlichen Paraffineinbettung.

Nach Field und Martin bringt man das gut entwässerte Präparat zunächst für einige Stunden in absoluten Alkohol und Toluol zu gleichen Teilen. Dann kommen die Stücke für einige Stunden in ein Celloidinparaffingemisch, welches in folgender Weise bereitet wird: In einer Mischung von absolutem Alkohol und Toluol wird Celloidin bis zur Konsistenz von Nelkenöl gelöst, dann Paraffin bis zur Sättigung bei einer Temperatur von 20—25° C. Von hier aus Übertragung der Stücke in mit Paraffin gesättigtes Chloroform, dann in gewöhnliche Paraffinlösung.

## Andere Einbettungsmethoden.

Die Einbettung in Seifen verschiedener Komposition und in Mischungen von Eiweiß dürfte seit der Einführung des Celloidins und Paraffins in die mikroskopische Technik für pathologisch-anatomische Untersuchungen höchstens dann noch zur Anwendung kommen, wenn der Kontakt des Untersuchungsobjektes mit Alkohol usw. ganz vermieden werden soll, namentlich wenn spirituslösliche Bestandteile im Präparat erhalten werden sollen.

Döllken empfiehlt namentlich Rizinusseife, für härtere Gewebe Stearinseife, für ganz weiche Oleinseife.

Diese Seifen werden in der Weise bereitet, daß man in 20—30-proz. Natronlauge Rizinusöl resp. Stearinsäure usw. so einträgt. daß NaOH in geringem Maße vorwaltet. Die Seifenlösung muß noch einige Zeit kochen, dann läßt man erkalten und erstarren, und befreit den Seifenkuchen durch Auspressen teilweise von der überschüssigen Natronlauge, der Rest von NaOH wird durch Dialyse, oder durch häufiges Lösen, Fällen und Auspressen entfernt.

Zur Einbettung wird eine ziemlich dünne Seifenlösung, 3—5-proz., in destilliertem Wasser benutzt. In diese werden die 1 cm hohen Stückchen aus Formalin, Müller'scher Flüssigkeit usw. gebracht und 36—72 Stunden bei 35°—40° C in bedeckter Schale gelassen. Dann Eindunstenlassen bis zur Erstarrung durch Abnehmen des Deckels, Aufkitten der Blöcke mit Wasserglas auf Holzstücke. Schneiden wie bei Paraffin. Vor der Färbung muß die Seife gut ausgewaschen werden.

Eine weitere primitive Einbettungsmethode besteht darin, daß man das zu schneidende Objekt, welches nur wenige Millimeter hoch sein darf, auf einem Kork in einen großen Tropfen Gummilösung herein-

stellt. Dann bringt man den Kork in 95-proz. Alkohol, wo der Gummi erstarrt und einen festen Mantel um das Präparat bildet.

Bolton und Harris verwenden ein Gemisch von 5-proz. Agar-Agar und Formol, bringen das Stück Gewebe direkt hinein und erhalten es auf einer Temperatur von 60—70° C 1—2 Stunden lang oder länger. Sodann werden Blöcke wie beim Celloidinverfahren hergestellt und in 95-proz. Alkohol oder in einer Mischung von Alkohol, Formol und Glyzerin gehärtet.

---

Siebentes Kapitel.

# Anfertigung von Schnitten. Mikrotome. Serienschnitte.

Auch von gefärbten Präparaten kann man mit dem Rasiermesser oder Doppelmesser zur raschen Orientierung Schnitte in derselben Weise herstellen, wie es für frische Untersuchungen (S. 8) beschrieben ist. Besonders eignen sich hierzu in Alkohol konservierte Organe. Für alle feineren Untersuchungen aber bedarf man der Mikrotome, bei denen die nötige Härte des Objekts durch Gefrierenlassen, oder durch die beschriebene Einbettung in Celloidin oder Paraffin erreicht wird. Für jeden dieser Zwecke sind besondere Mikrotome konstruiert worden. Doch genügt es im allgemeinen, wenn man ein Mikrotom für eingebettete und eines für Gefrierpräparate zur Verfügung hat. Für die Zwecke des Praktikers leisten die Hobelmikrotome (Studentenmikrotome) Ausgezeichnetes, da man mit ihnen Gefrierschnitte und Paraffinschnitte, bei einigen Konstruktionen (Jung, Heidelberg) auch Celloidinschnitte anfertigen kann.

## I. Gefriermikrotome und ihre Anwendung.

Die Gefriermikrotome haben durch ihre handliche Konstruktion und ihre Vorzüge sich eine große Beliebtheit und weite Verbreitung erworben. Fast unentbehrlich für den Chirurgen, der möglichst schnell nach einer Diagnose exzidierter Stückchen usw. verlangt, bieten sie auch für die feinsten wissenschaftlichen Untersuchungen manche wertvollen Vorteile. Neben der Schnelligkeit, mit der sie die Anfertigung guter Präparate gestatten, machen sie eine Alkoholhärtung überflüssig und lassen so alkohollösliche Substanzen, wie Fett, in den Schnitten unangetastet. Dadurch ermöglichen sie die Anwendung der neueren Fettfärbemittel.

Die Gefriermikrotome werden in solider Konstruktion von der Firma R. Jung, Heidelberg, geliefert. Die ältere Form, das Studentenmikrotom A, ist nur für Gefrier- und Paraffinschnitte eingerichtet und wegen seines billigeren Preises und der längeren Gebrauchsfähigkeit der Messer dort vorzuziehen, wo für Celloidinpräparate eines der später genannten Mikrotome zur Verfügung steht. Soll in einem kleinen Laboratorium oder für die Bedürfnisse des praktischen Arztes womöglich

ein Instrument für alle Einbettungsarten Verwendung finden, so ist das neue Modell, Studentenmikrotom B, empfehlenswert, das auch Celloidinschnitte mit ziehender Messerstellung gestattet.

Auch die von Sartorius-Becker in Göttingen gelieferten Gefriermikrotome sind sehr empfehlenswert.

Die Gefriermikrotome werden an den Tisch angeschraubt und tragen eine Gefrierkammer, die durch eine Mikrometerschraube gehoben wird und oben durch eine Metallplatte abgeschlossen ist. Auf diese kommt das zu schneidende Objekt, über das ein kurzes Messer gleitet; sehr praktisch ist die automatische Regulierung der Schnittdicke, die an den neueren Modellen um je 2,5 $\mu$ variiert werden kann. Bei der gewöhnlichen Anwendung wird man unter eine Schnittdicke von 10 $\mu$ nicht herunter zu gehen brauchen, doch sind auch Schnitte von 20 $\mu$, für manche Objekte auch 30 $\mu$ noch gut brauchbar. Da die Stücke der schrumpfenden Wirkung des Alkohols und der übrigen Einbettung nicht unterworfen sind, enthalten die Schnitte bedeutend weniger Zelllagen, als in gleichdicken Schnitten eingebetteter Präparate sind.

Das Gefrieren wird entweder mit Ätherspray erreicht, der jedoch besonders in der heißen Jahreszeit einen großen Ätherverbrauch erfordert, oder mit Chloräthyl; neuerdings wird auch Anästhol (zu beziehen von Speyer und Karger, Berlin, Lothringerstr. 41) als ökonomisch empfohlen. Am billigsten und bequemsten ist für größere Laboratorien die flüssige Kohlensäure, deren Flasche mit der Gefrierkammer durch ein Metallrohr verbunden wird; nach geringem Öffnen des Ventils friert das Präparat fast momentan.

Das Gefrierverfahren findet an frischen Objekten nur selten Anwendung; gleichwohl kann es für gewisse Zwecke wertvoll sein, da gelindes Gefrieren der Struktur und Funktionsfähigkeit des Protoplasmas noch nicht zu schaden braucht.

Am häufigsten wird Fixierung in 4—10-proz. Formollösung angewandt; dann werden nach $^1/_2$—1-stündigem Wässern dünne Scheiben auf die Platte des Gefriermikrotoms gebracht, mit etwas Wasser umgeben und gefroren. Ein leichtes Andrücken mit einem Skalpellstiel o. dgl. befördert das Festhaften. Das Präparat muß vollständig durchfroren sein, sonst enthalten die Schnitte Lücken; anderseits darf es nicht zu hart gefroren sein, da sonst das Messer nicht ordentlich faßt und die Schnitte ein streifiges Aussehen zeigen; eventuell kann man durch Anhauchen die oberste Schicht etwas erweichen. Mit der automatischen Einstellung kann man so in kurzer Zeit eine große Anzahl von gleichmäßigen Schnitten herstellen, die man, ev. zu mehreren, mit Pinsel oder Finger von dem Messer abnimmt und in eine Schale mit Wasser legt; oft kann man auch die Schnitte direkt in die vorgehaltene Schale schleudern, wenn man die Messerklinge ganz trocken hält. Auch aus Müller'scher Flüssigkeit oder Müller-Formolmischung kann man nach kurzer Auswässerung gute Gefrierschnitte anfertigen. Bei dem Kohlensäureverfahren ist ein Auswässern kaum nötig.

Auch von Spirituspräparaten und Celloidinblöcken lassen sich Gefrierschnitte anfertigen, doch muß dann eine gründliche Auswässerung vorhergehen. Meist ist eine 12—26-stündige Wässerung im Brütschrank

oder in fließendem Wasser nötig. Ebenso ist bei KAISERLING-Präparaten ein längeres Auswässern erforderlich.

Die Gefrierschnitte sind sofort zur Färbung verwendbar, können aber auch in Wasser, dünner Formollösung oder verdünntem Spiritus aufbewahrt werden. Vor der Färbung bringt man die Schnitte zweckmäßig auf einige Minuten in 96-proz. Alkohol (für Fettpräparate nur 50-proz.); dadurch wird eine bessere Färbbarkeit erreicht; außerdem verlieren die Schnitte die ihnen anhaftenden Luftblasen und breiten sich bei Übertragung in wässerige Lösungen gut aus.

Schnitte, die sehr leicht ihren Zusammenhang verlieren, kann man auf den Objektträger ankleben, indem man sie mit diesem aus Wasser auffängt, mit Fließpapier abtrocknet, durch 96-proz. und absoluten Alkohol entwässert und mit sehr verdünnter Celloidinlösung übergießt. Nach dem Trocknen kann man den aufgeklebten Schnitt den Färbeprozeduren unterziehen. Auch mit Eiweißgelatinemischung kann man das Aufkleben erreichen; diese wird durch Einwirkung von 40-proz. Formalindämpfen und nachheriges Behandeln mit 10-proz. Formalinlösung fest; auf diese Weise bleiben auch alkohollösliche Bestandteile erhalten. Wenn auch mit diesen Hilfsmitteln der Gewebszusammenhang nicht genügend gewahrt werden kann (Curettements, papilläre Geschwülste usw.), so muß ein Einbettungsverfahren angewandt werden.

### Gefrierschnellverfahren.

Zur Schnelldiagnose fixiert man kleine Stückchen $^1/_2$—2 Stunden in 10-proz. Formol im Brutschrank oder Paraffinofen, wässert kurz und fixiert die Gefrierschnitte in Alkohol nach. In besonders eiligen Fällen kann man eine kleine Scheibe in einem Reagenzglas mit 10—40-proz. Formol erhitzen, sofort schneiden und nach Alkoholbehandlung färben.

## II. Das Schneiden eingebetteter Präparate.

Die hierfür erforderlichen Mikrotome werden von den Firmen Becker-Göttingen, Jung-Heidelberg, Schanz-Dresden u. a. konstruiert. Es ist oben erwähnt worden, daß in einem Teil der zum Gefrierschneiden verwendeten Hobelmikrotome auch Vorrichtungen zum Schneiden eingebetteter Präparate angebracht werden können. Diese Universalinstrumente genügen für viele praktische Zwecke und sind auch so preiswert, daß auf eine Beschreibung der billigen, früher gebräuchlichen Zylindermikrotome, bei denen die Messerführung mit der Hand erfolgte, verzichtet werden kann. Für feinere Untersuchungen und zur Herstellung größerer Schnitte bedarf man eines der größeren Mikrotome. Diese können nach 2 Prinzipien konstruiert sein; entweder bleibt das Objekt beim Schneiden feststehen und das Messer wird in einem Schlitten darüber hinweggeführt (Schlittenmikrotome) oder das Messer steht fest und das Objekt wird an seiner Schneide vorbeibewegt.

### 1) Schlittenmikrotome.

Bei den Schlittenmikrotomen wird das Messer in einem Schlitten geführt, der auf drei, ganz glatt polierten und gut geölten Schienen hin und her bewegt wird.

Das Präparat wird entweder von unten nach oben direkt in einer Klammer durch eine Schraube in die Höhe gehoben, oder es kommt

dadurch langsam um eine gewisse Anzahl von Teilstrichen in die Höhe, daß es auf einer schiefen Ebene durch Schraubenvorrichtung allmählich vorgeschoben wird.

Das Präparat wird dabei entweder direkt in einer Klammer oder einem in verschiedenen Richtungen beweglichen Objekthalter befestigt, oder es wird auf einen passenden Holz- oder Stabilitblock (s. S. 30) aufgeklebt und mit diesem in die Objektklammer eingeklemmt.

Will man uneingebettete Spirituspräparate schneiden, so klebt man sie mit flüssigem Leim auf den Klotz auf. In starkem Spiritus oder absolutem Alkohol erstarrt die Leimmasse in einigen Stunden.

Schneller und sicherer erreicht man das Festkleben noch mit einer Glyzeringelatinemischung: man läßt Gelatine einige Stunden in Wasser aufquellen, gießt dann das Wasser ab und kocht die aufgequollene Gelatine mit dem gleichen Volumen Glyzerin, dem man gegen spätere Schimmelbildung etwas Kampfer oder noch besser eine Spur Sublimat zugesetzt hat. Die flüssige Masse wird durch Leinwand filtriert und erstarrt dann. Zum Gebrauch macht man jedesmal ein erbsengroßes Stückchen derselben auf einem sog. Kartoffelmesser über der Flamme flüssig, bringt den flüssigen Tropfen auf den Kork und setzt das Präparat darauf. In Alkohol wird dann die Masse sehr rasch starr und fest.

Beim Schneiden solcher Präparate muß Messerklinge und Objekt stets reichlich mit Spiritus befeuchtet werden, den man mit einem Pinsel aufträgt.

Die Schlittenmikrotome gestatten nach Belieben eine quere und schräge Messerstellung. Da letztere für Celloidinschnitte unbedingt erforderlich ist, sind diese Konstruktionen für alle Methoden brauchbar. Der Grad der Schrägstellung richtet sich nach Art und Härte des Präparats und muß ausprobiert werden. Im allgemeinen empfiehlt sich für Celloidinpräparate eine möglichst spitzwinklige Stellung des Messers, da dann die ganze Klinge ausgenutzt werden kann. Die Führung des Messerschlittens soll möglichst gleichmäßig erfolgen; an manchen Mikrotomen bestehen dafür besondere mechanische Führungsvorrichtungen.

Messer und Präparat müssen bei Celloidineinbettung stets ausgiebig mit Spiritus befeuchtet werden.

Paraffinpräparate werden völlig trocken und meist mit querer Messerstellung geschnitten.

Für besonders große Schnitte (Gehirn, Auge usw.) existieren Tauchmikrotome, bei denen man die Präparate unter Flüssigkeit schneiden kann. Dasselbe ist so eingerichtet, daß das betreffende Präparat in einem Metallzylinder durch einen Stempel in die Höhe geschoben wird. Dieser Metallzylinder befindet sich mit dem Messer in einer Wanne, die mit Wasser oder Spiritus gefüllt werden kann.

**2) Mikrotome mit feststehendem Messer.**

Diese sind nur für Paraffinpräparate geeignet, da die Messerstellung stets eine quere bleibt. Sie bieten besonders für Bänder- und Serienschnitte Vorteile. Bei den Schaukelmikrotomen wird das Objekt auf einem zweiarmigen Hebel an dem Messer vorbeigeführt; man kann hierfür Rasiermesser benutzen. Bei dem Tetrandermikrotom (Jung-Heidelberg) erfolgt die Objektführung auf Achsen. Die Einstellung der Schnittdicke kann automatisch geregelt werden, sodaß nach jedem Schnitt das Objekt um die gewünschte Mikrenzahl vorgeschoben wird.

### Mikrotommesser.

Die am häufigsten benutzten Messer sind auf der Unterseite plan, auf der Oberseite konkav geschliffen; doch ist die Unterseite nach der

Schneide zu meist noch etwas abgeschrägt. Das Schleifen der Messer sollte man nur geübten Instrumentenmachern überlassen. Dagegen soll das Abziehen auf einem weichen Streichriemen möglichst häufig vorgenommen werden; dazu versieht man das Messer mit einer Abziehvorrichtung und führt es ohne Druck etwa 12-mal auf jeder Seite über das Leder. Sorgfältige Reinigung nach jedem Gebrauch, wobei jede Berührung der Schneide vermieden werden muß, trägt ebenfalls zur Verlängerung der Brauchbarkeit bei. Erwünscht ist, daß der Messerhalter eine Veränderung der Neigung des Messers erlaubt. Je nach dem Schliff des Messers und der Natur des Objektes muß der günstigste Schneidewinkel ausprobiert werden.

## Celloidinpräparate.

Schräge Messerstellung; Messerschneide und Objekt ausgiebig mit 70—80-proz. Alkohol befeuchten. Langsame und gleichmäßige Messerführung. Der Schnitt wird mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in eine Schale mit 70—80-proz. Alkohol übertragen; in diesem kann er beliebig lange aufgehoben oder sofort zur Färbung verwandt werden. Meist werden die Celloidinschnitte in dem Celloidinmantel gefärbt und konserviert. In anderen Fällen, namentlich bei Anilinfärbungen, ist es oft geboten, vor der Färbung das Celloidin aus dem Präparat vollkommen zu entfernen. Man bringt dann die Schnitte aus dem Wasser oder verdünnten Spiritus, in welchem sie von dem Messer des Mikrotoms aufgenommen wurden, in absoluten Alkohol, von diesem für 10—15 Minuten in ein Gemisch von absolutem Alkohol und Äther zu gleichen Teilen oder in Nelkenöl, dann wieder zurück in absoluten Alkohol, schließlich in Wasser, und nun erst in die Farbe.

## Paraffinpräparate.

Schräge bis quere Messerstellung. Objekt und Messer völlig trocken. Bei schräger Messerstellung langsames Schneiden, bei querer ist oft ein rascheres, ruckweises vorteilhaft. Ist das Paraffin zu weich, so schneide man in kalter Luft oder kühle den Block in kaltem Wasser. Ist das Paraffin zu hart, so kann man sich oft durch Anhauchen der Schnittfläche helfen; oder man schneide im warmen Zimmer, resp. dicht am Ofen.

Von sehr empfindlichen Objekten und zur Herstellung sehr feiner Schnitte kann man die Oberfläche mit einer stark verdünnten Celloidinlösung bestreichen und trocknen lassen. Der Schnitt wird wie gewöhnlich aufgeklebt, das Celloidin mit Alkohol-Äther entfernt.

Das Rollen der Schnitte verhindert man am besten durch Anhauchen des Messers oder durch sanftes Andrücken mit einem weichen Pinsel oder durch Auflegen eines schmalen, bandförmigen Streifens Kartonpapier (Visitenkarte), mit dem die linke Hand den Schnitt an die Fläche des Messers andrückt. Auch besondere am Messer angebrachte Schnittstrecker sind angegeben worden. Am besten strecken sich die Schnitte, wenn man sie auf ein 40—50° warmes Wasserbad in geräumiger Schale bringt; die Temperatur muß natürlich unter dem Schmelzpunkt des verwendeten Paraffins liegen.

Nach Orsós (Zentralblatt für Pathologie 1906, Nr. 24) kann man große und faltenlose Schnitte herstellen, wenn man das mit Äther-

Alkohol sorgfältigst entfettete Messer mit ausgekochtem Wasser beschickt und mit schräger Messerstellung schneidet.

Die Weiterbehandlung der Paraffinschnitte kann nun entweder mit oder ohne Aufkleben erfolgen. In letzterem Falle bringt man die Schnitte direkt vom Messer in Xylol, dann in absoluten Alkohol, verdünnten Spiritus und Wasser. Man kann sie dann wie Gefrier- und Celloidinschnitte in die einzelnen Farbflüssigkeiten und Reagentien übertragen. Ein Färben der Schnitte ohne vorherige Lösung des Paraffins ist im allgemeinen nicht zu empfehlen. Dünne und empfindliche Präparate müssen auf Objektträger oder Deckgläschen aufgeklebt werden. Letztere müssen zu diesem Zwecke sorgfältig gereinigt, besonders durch Alkohol-Äther fettfrei gemacht sein. Das Festhaften der Schnitte wird durch folgende Methoden erreicht:

1) Durch Kapillarattraktion. Man bringt die Schnitte entweder direkt vom Messer auf den mit erwärmtem Wasser bedeckten Objektträger, wobei man sich auch des heizbaren Tischchens von Born bedienen kann. Oder man fängt aus dem vorerwähnten Wasserbade mit Objektträger oder Deckgläschen die Schnitte auf. Durch Schräghalten läßt man das überflüssige Wasser ablaufen, entfernt den Rest durch Absaugen und Abtupfen mit Fließpapier. Dann bringt man die fest anhaftenden Schnitte auf 6—24 Stunden in den Brütofen bei 37°. Von da kommt der Objektträger zur vollständigen Entfernung des Paraffins in Xylol, und der Schnitt wird in Kanadabalsam eingeschlossen, wenn die Präparate schon vorgefärbt waren; ist das nicht der Fall, so kommen die Schnitte aus dem Xylol in absoluten Alkohol, 96-proz. Spiritus, Wasser, Farbe, Auswaschflüssigkeit, Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Meist erreicht man mit dieser Methode ein genügendes Festhaften der Schnitte. Nur bei Anwendung stärkerer alkalischer oder saurer Flüssigkeiten ist es oft vorteilhaft, sich eines Aufklebemittels zu bedienen. Als solche sind unter anderen verwandt worden:

a) Mischung von Nelkenöl und Kollodium, welche in ganz dünner Schicht auf den Objektträger aufgestrichen wird. Nachdem die Schnitte aufgedrückt und aufgeklebt sind, bringt man den Objektträger für 5—10 Minuten auf ein Wasserbad oder in den auf 60° erwärmten Thermostaten.

b) Glyzerin-Eiweißlösung. Man stellt sich dieselbe so her, daß man ein abgemessenes Quantum von Eiweiß zu Schaum schlägt und dann mit dem gleichen Volum reinen Glyzerins versetzt. Die Masse wird filtriert und in ganz dünner Schicht auf den Objektträger aufgetragen. Nachdem die Paraffinschnitte aufgelegt sind, bringt man den Objektträger für kurze Zeit aufs Wasserbad oder in den Brütschrank bei 60°, wo die Lösung erstarrt und die Schnitte fest ankleben.

c) Schellacklösung. Man stellt sich eine konzentrierte Lösung von weißem Schellack in absolutem Alkohol her und breitet diese Lösung mit einem Glasstab ganz dünn auf dem erwärmten Objektträger aus. Man drückt nun die einzelnen Schnitte auf der Schellackdecke an und setzt dann in einem Gefäß den Objektträger den Dämpfen einer auf dem Boden befindlichen kleinen Menge von Äther aus.

Nachher: Wasserbad oder Wärmeschrank — Xylol zur Entfernung des Paraffins usw., wie oben.

Die Klebemittel haben alle den Nachteil, daß sich Falten, die im Schnitte vorhanden sind, nicht mehr ausgleichen lassen. Diesem Mangel begegnet die sog.

**2) Japanische Methode.** Man bringt auf den Objektträger eine minimale Glyzerin-Eiweißlösung (s. oben b), verstreicht diese so fein

wie möglich, und bringt dann auf die Eiweißschicht, die man eventuell vorher im Thermostaten noch bei 70° koagulieren lassen kann, etwas Wasser. Nun werden die Schnitte aufgelegt, die Ausbreitung eventuell durch ganz vorsichtiges Erwärmen über der Spirituslampe befördert, das überschüssige Wasser mit Fließpapier abgesaugt und das Präparat bei 30—35° getrocknet.

Gebhardt empfiehlt, den Objektträger mit einer dünnen Schicht Rizinusöl-Kollodium (Kollodium 2, Äther 2, Rizinusöl 3 Teile) zu versehen und dann den Schnitt auf diesem in einer ziemlich dicken Lage erwärmten Wassers auszubreiten.

Albrecht und Stark empfehlen folgendes Verfahren: Man bringt den Schnitt auf den Objektträger, den man zuerst anhaucht, und dann mit einem Tropfen angewärmten Wassers beschickt. Durch wiederholtes Anhauchen streckt sich der Schnitt vollständig. Dann Anpressen mittels vollkommen glatten Fließpapiers, welches mit 5 Tropfen absoluten Alkohols befeuchtet ist. Dann Lösen des Paraffins durch Xylol, Verdrängen des Xylols durch absoluten Alkohol. Nun übergießt man den Schnitt mit einer ganz dünnen Celloidinlösung, die man vom schief gehaltenen Objektträger wieder ablaufen läßt. Aufgießen von 95-proz. Spiritus ein paar Sekunden lang, und Übertragen des Objekts in Wasser zur beliebigen Weiterbehandlung.

Die Celloidinlösung muß so dünn sein, daß sie höchstens eine ganz leichte Trübung zeigt. Man setzt von einer dünnen Celloidinlösung reinem Äther einige Tropfen zu, bis wolkige Trübungen entstehen und fügt dann so viel absoluten Alkohol zu, bis diese wieder verschwinden, und dann noch etwas absoluten Alkohol im Überschuß.

3) Will man die Präparate möglichst rasch nach dem Schneiden färben, so genügt es meist, die Schnitte auf dem mit Eiweißglycerin beschickten Objektträger oder Deckgläschen sorgfältig mit einem feinen Pinsel faltenlos auszubreiten. Nach kurzem Erwärmen können die Präparate entparaffiniert und sofort gefärbt werden. In gleicher Weise kann man die Schnitte in großer Zahl auf Glimmerplatten aufkleben und beliebig lange aufheben. Besonders für Kurse empfiehlt sich dieses Verfahren, da man bei Bedarf die ganzen Glimmerplatten den Färbeprozeduren unterwerfen und dann beliebig zerschneiden kann.

## Serienschnitte.

Eine besondere Technik erfordert die Anfertigung von Serienschnitten.

1) Für Celloidinpräparate bedient man sich dazu am besten des Weigert'schen Verfahrens. Man schneidet sich schmale Streifen von Klosettpapier, deren Breite den Durchmesser der aufzulegenden Schnitte etwa um das Doppelte übertrifft. Der Schnitt wird nun, wenn er sich nicht von selbst dicht an die Schneide des Messers anlegt, vorsichtig mit der Nadel dorthin gerückt. Dann legt man den Papierstreifen von oben her auf den Schnitt und zieht ihn mit letzterem wagerecht oder ein klein wenig nach oben abhebend in der Richtung der Messerfläche nach links hin fort. Das Abziehen gelingt aber nur, wenn der Schnitt nicht in gar zu viel Spiritus schwimmt. Der nächste Schnitt kommt auf dem Papierstreifen immer an die rechte Seite des

vorigen. Die Streifen müssen nun, während die einzelnen Schnitte aufgelegt werden, namentlich aber auch dann, wenn sie die entsprechende Anzahl von Schnitten aufgenommen haben und weitere Streifen präpariert werden, feucht gehalten werden. Zu dem Zwecke stellt man neben dem Mikrotom einen flachen Teller auf, der mit einer einfachen Lage von spiritusdurchtränktem Fließpapier und darüber mit einem Blatt Klosettpapier versehen ist. Auf dieses legt man die einzelnen Streifen so, daß die Präparate nach oben sehen.

Ist das ganze Stück geschnitten, so bringt man jeden Papierstreifen, die Präparate nach unten, auf eine Glasplatte, die man vorher mit einer dünnen Kollodiumschicht bedeckt hat, und drückt ihn dort ganz sanft an. Dann gelingt es leicht, die Papierstreifen so abzuziehen, daß die Schnitte in richtiger Reihenfolge auf der Kollodiumschicht haften bleiben. Ist noch Flüssigkeit auf der Oberfläche vorhanden, so entfernt man diese, ohne jedoch die Schnitte ganz trocken werden zu lassen. Sofort bedeckt man dann die Schnitte mit einer zweiten, ebenfalls dünnen und gleichmäßigen Kollodiumschicht und stellt dann die Platte auf die Kante, um die folgenden weiter zu behandeln. Man markiert dann noch die Reihenfolge der Schnitte durch einen feinen in Methylenblau getauchten Stift.

Bringt man nun die so behandelten Glasplatten in Färbeflüssigkeit — es ist zunächst die Weigert'sche Hämatoxylinlösung zur Färbung des Zentralnervensystems vorgesehen — so löst sich sehr bald die ganze Kollodiummasse mit den eingeschlossenen Schnitten von der Unterlage ab.

Nach beendeter Färbung kann man die Kollodiumplatten in passender Weise unter Wasser mit der Schere zerschneiden; sie kommen dann in 96-proz. (nicht absoluten!) Alkohol. Die Schnitte dürfen nicht in Nelkenöl aufgehellt werden, und da auch Origanumöl wegen seiner großen Empfindlichkeit gegen Wasserreste unbequem ist, so hellt man die Schnitte in **Karbolxylol** auf (Mischung von Xylol 3, Acidum carbolic. pur. 1). Auf den Boden der Flasche, in der man diese Mischung, die immer wieder gebraucht werden kann, aufbewahrt, bringt man etwas ausgeglühtes weißes Kupfervitriol. Wenn sich dasselbe bläut, wird es durch neues ersetzt oder von neuem ausgeglüht.

Will man die Serienschnitte auf der einen Seite frei von Kollodium lassen, um sie unmittelbarer der Einwirkung der Färbeflüssigkeit auszusetzen, so kann man sich der Modifikation von Dimmer bedienen: Man übergießt die Glasplatten mit einer Gelatinelösung (16 g in 300 g warmem Wasser gelöst) und läßt staubfrei trocknen, meist etwa 2 Tage. Die Schnitte werden dann ebenso wie bei dem Weigert'schen Verfahren auf die Gelatine mittels Klosettpapier gedrückt und mit 70-proz. Alkohol feucht gehalten. Dann Abtrocknen und Übergießen mit: Photoxylin 6,0 — Alkohol absolut. und Äther āā 100. Antrocknen lassen. Dann in Wasser 50—55°, nachdem man am Rande die Photoxylinschicht eingeritzt hat, um das Eindringen des Wassers zu begünstigen. Hier rasche Abhebung vom Glase, Übertragen in Farbe usw.

Sehr empfehlenswert ist eine Methode von Bauer, die sich an eine Vorschrift von Obregia anlehnt. Man begießt die gereinigten Glasplatten mit einer dünnen Schicht folgender Mischung:

| | |
|---|---|
| Lösung von gepulvertem Kandiszucker (1 : 1) | 300 ccm |
| Alkohol (80-proz.) | 200 ccm |
| Dextrinlösung (1 : 1) | 100 ccm |

(in der angegebenen Reihenfolge zu mischen). Nach staubfreiem Trocknen werden die Präparate wie bei den anderen Methoden aufgeklebt, mit einer dünnen Celloidinlösung übergossen. Nach Anritzen der Ränder löst sich dann die ganze Platte im Wasser ab.

Auburtin empfiehlt die Schnitte mit etwas 70-proz. Alkohol, der ihnen vom Schneiden her gewöhnlich noch anhaftet, auf Objektträgern zu ordnen. Dann wird der 70-proz. Alkohol entfernt und Fließpapier aufgedrückt. Ehe die Schnitte zu trocken geworden sind, läßt man vorsichtig vom Rande her eventuell mehrmals absoluten Alkohol und Äther zu gleichen Teilen überfließen. Dann wartet man ab, bis der Alkohol-Äther verdunstet ist, in welchem Falle man auf dem Glase eine gleichmäßig dünne, fest anhaftende Celloidinmembran hat. Dann in 70-proz Alkohol, Wasser, Farbe usw. Entwässern in 95-proz. Alkohol unter Zuhilfenahme von Fließpapier. Aufhellen in Karbolxylol.

Langhans (Ott und Weiss, Virchow's Arch. 135 und 136) empfiehlt bei vorher gefärbten Celloidinblöcken Schneiden unter absolutem Alkohol, Übertragen auf Objektträger, die mit einer dünnen Schicht gewöhnlichen oder eosinhaltigen Origanumöls bedeckt sind. Man kann auch auf die Messerklinge selbst statt Alkohol Origanumöl bringen.

Tandler empfiehlt, die Celloidinschnitte vom Messer weg in Reihen auf Objektträger zu bringen, den überschüssigen Spiritus mit Fließpapier zu entfernen und die mit Schnitten belegten Objektträger mit einem befeuchteten Papierstreifen zu bedecken, der doppelt so lang ist, wie der Objektträger. Das freie Ende des Streifens wird auf die untere Fläche des Objektträgers umgeschlagen und ein zweiter Objektträger fest dagegen gepreßt. Die so behandelten Objektträger werden in eine Wanne mit Wasser resp. Spiritus übereinander geschichtet. Die Färbung soll nach der Empfehlung des Autors so vorgenommen werden, daß man die Papierstreifen wechselt und gegen solche vertauscht, die mit der verdünnten Farblösung durchtränkt sind. Dann wieder gewöhnliche Papierstreifen und Auswaschen in Wasser. Man kann aber wohl auch den Objektträger mit dem bedeckenden Fließpapier in verdünnte Farblösung bringen.

Eine verhältnismäßige einfache Methode hat Darkschewitsch angegeben, um Schnittserien anzufertigen und in ihrer Reihenfolge aufzubewahren.

Ein Glaszylinder oder ein Glasgefäß von dem ungefähren Umfang der zu bearbeitenden Schnitte wird mit Spiritus gefüllt. Darauf schneidet man sich aus Löschpapier Scheiben von solcher Größe, daß sie gut in das Glasgefäß passen. Diese Scheiben werden mit einem gewöhnlichen Bleistift numeriert, der Reihenfolge nach gelegt und gut mit Spiritus durchtränkt. Jeder Schnitt wird nun in der Weise von dem Messer des Mikrotoms entfernt, daß man das Löschpapier sanft aufdrückt und dann abzieht. Die Papierstreifen werden dann, die Schnittseite nach oben, in dem Glaszylinder in der richtigen Reihenfolge säulenförmig übereinander gelegt, so daß jeder Schnitt auf dem mit der entsprechenden Nummer versehenen Papierstück liegt.

Es können die Schnitte beliebig lange aufgehoben werden. Will man färben, so entfernt man den Spiritus, spült eventuell noch mit destilliertem Wasser nach und gießt dann die Farbstofflösung auf. Ebenso verfährt man im weiteren Verlauf mit den anderen etwa anzuwendenden Reagentien. Die letzteren können auch auf flachen Tellern zur Einwirkung gebracht werden. Die Schnitte lösen sich von selbst nicht wieder von ihrer Unterlage ab.

Auch viereckige Glaskasten, die in eine große Anzahl kleinerer Quadrate mit numerierten Farbnäpfchen abgeteilt sind, kommen zur Verwendung, um Serienschnitte anzufertigen.

2) Serienschnitte von Paraffinpräparaten fertigt man in der Weise an, daß man die Schnitte in bestimmter Reihenfolge auf Objektträgern aufklebt, die mit einer Mischung von Nelkenöl und Kollodium 3 : 1 bestrichen sind. Das weitere Verfahren, Entfernung des Paraffins, Färben usw. ist dasselbe, wie S. 39 angegeben wurde. Die einzelnen Objektträger kann man numerieren. Sind die Präparate nicht vorgefärbt, so färbt man auf dem Objektträger. Ein dem Weigert'schen nachgebildetes Verfahren, welches sich dann empfiehlt, wenn die Schnitte so groß sind, daß man nicht eine ganze Anzahl derselben auf einem Objektträger unterbringen kann, hat Strasser angegeben.

Man stellt sich Papiergummikollodiumplatten her, welche die Rolle der Weigert'schen Kollodiumglasplatten übernehmen, indem man gut ausgespanntes Schreibpapier mit einer Mischung von 4 Teilen des offizinellen Mucilag. Gumm. Arabic. und 1 Teil Glyzerin bestreicht. Später empfahl Strasser als Klebemittel: Gumm. Arabic. 80—100, Wasser 100, Glyzerin 10, mit Zusatz von etwas Karbolsäure. Ist das Papier trocken geworden, so streicht man möglichst schnell Kollodium darüber, welches bis zur Konsistenz des gewöhnlichen Glyzerins durch Äther verdünnt ist, und dem $^1/_{100}$ Volumteil Rizinusöl zugesetzt ist. Dieser Anstrich wird mehrmals wiederholt. Vor dem Schneiden des Paraffinstückes wird nun auf die so beschaffene Papiergummikollodiumplatte eine Klebemasse aufgetragen von

| | | |
|---|---|---|
| Kollodium | 2 | Volumteile |
| Äther | 2 | „ |
| Rizinusöl | 3 | „ |

Die Schnitte werden möglichst glatt auf diese Klebemasse aufgelegt und dann mit ebenderselben Klebemasse bedeckt.

Zur Entfernung des Paraffins werden die Platten für eine halbe bis mehrere Stunden in Terpentinöl gebracht und von da in Chloroform übertragen. Aus dem Chloroform kommen die Platten noch 15 Minuten in 80—85-proz. Alkohol. Bringt man nun die Platten vor der Färbung in Wasser oder 10-proz. Spiritus, so löst sich der Gummi und mit ihm die Papierplatte ab und es kann dann in derselben Weise verfahren werden, wie bei der Weigert'schen Methode. Selbstverständlich kann die Entfernung des Papiers nur in wässeriger Farbstofflösung vor sich gehen.

Auch mit der Methode von Bauer (s. S. 41) lassen sich Paraffinserien herstellen. Man entfernt dazu vor dem Übergießen mit Celloidin, das Paraffin in Xylol und Alkohol absolutus.

## Die plastische Rekonstruktion

ist in neuester Zeit in der pathologischen Histologie speziell zum Studium des Geschwulstbaues herangezogen worden. Von verschiedenen Verfahren kommt am meisten die Plattenmodelliermethode von Born in Betracht. Ihr Prinzip ist, von einer lückenlosen Serie jeden Schnitt vergrößert aufzuzeichnen und auf einer Wachsplatte, deren Dicke das Ebensovielfache der Schnittdicke sein muß wie die Flächenvergrößerung beträgt, auszuschneiden. Durch genaues Zusammenfügen der Wachsplatten

muß ein in allen Dimensionen gleichmäßig vergrößertes Modell entstehen. Betreffs der speziellen Technik sei auf Peter's Artikel „Plastische Rekonstruktion" in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, Berlin-Wien und Peter, Die Methoden der Rekonstruktion, Jena 1906, verwiesen.

---

Achtes Kapitel.

## Weiterbehandlung und Färbung von mikroskopischen Schnitten.

Wenn man Schnitte von gehärteten Präparaten im ungefärbten Zustande untersucht, so können zur Erleichterung der Untersuchung alle bei der Untersuchung frischer Präparate in Kap. II angeführten Reagentien zur Anwendung kommen. Die Untersuchung wird in reinem Glyzerin oder in mit der Hälfte Wasser verdünntem Glyzerin vorgenommen.

Als Isolationsmethoden für Schnitte sind noch das Auspinseln oder Ausschütteln und die künstliche Verdauung zu erwähnen.

Die Methode des Auspinselns oder Ausschüttelns kommt namentlich in Betracht, wenn man den bindegewebigen Stützapparat von drüsigen Organen, oder wenn man das Stroma von Geschwülsten, besonders von Karzinomen, isoliert, nach Entfernung der Zellen, untersuchen will.

Beim Auspinseln verfährt man so, daß man den auf dem Objektträger ausgebreiteten Schnitt an einer Seite mit der Präpariernadel festhält und nun mit einem feinen Pinsel vorsichtig und wiederholt von der Nadel an nach der entgegengesetzten Seite hinfährt und so nach und nach alle Zellen entfernt. Man kann auch, genau in derselben Weise, das Auspinseln in einem Schälchen mit Wasser vornehmen.

Zum Ausschütteln bringt man den Schnitt in ein Reagenzglas, welches zum Teil mit Wasser gefüllt ist und schüttelt so lange, bis die Zellen ausgefallen sind.

Bei der Methode der künstlichen Verdauung, die übrigens eine ausgedehntere Verwendung in der pathologisch-histologischen Technik nicht gefunden hat, setzt man die Schnitte oder Stückchen mehrere Tage lang bei Brütofentemperatur der Einwirkung einer Trypsinlösung aus. Dann werden die Objekte in einem Reagenzglas mit Wasser ordentlich geschüttelt und schließlich in Kochsalzlösung untersucht.

Die Trypsinlösung stellt man sich in der Weise her, daß man ein frisches Rinderpankreas im Extraktionsapparat so lange mit Alkohol und Äther behandelt, bis eine weiße, leicht zerreibliche Masse zurückbleibt. Von dieser Masse wird ein Teil in 5—10 Teile 0,5-proz. Salicylsäurelösung 3—4 Stunden lang bei 40° C gebracht und dann filtriert.

Durch das Trypsin werden die Zellen und die Kittsubstanz in den Geweben zerstört, während die fibrillären Bestandteile erhalten bleiben.

## Allgemeines über die Färbetechnik.

Die moderne Färbetechnik beruht auf der Tatsache, daß die einzelnen Gewebe verschiedenen Farbstoffen gegenüber eine verschiedene Affinität zeigen, so daß durch Anwendung bestimmter Farbstoffe eine Gewebsart gegenüber ihrer Umgebung besonders hervorgehoben und deutlich gemacht werden kann.

Diese Affinität der einzelnen Gewebe zu bestimmten Farbstoffen tritt manchmal schon bei der einfachen Färbung hervor, indem nur eine bestimmte Gewebsart durch den Farbstoff überhaupt oder doch ganz vorzugsweise gefärbt wird. In anderen Fällen nehmen bei der Färbung zunächst alle Gewebe eines Schnittes gleichmäßig die Farbe an; es behält sie aber bei Anwendung bestimmter Entfärbungsmittel (Differenzierungsflüssigkeiten) nur ein Gewebe, während die anderen, die vorher ebenfalls die Farbe angenommen hatten, diese wieder abgeben.

Von ganz besonderer Wichtigkeit ist die Tatsache, daß sich auch die Bestandteile der einzelnen Zelle, Protoplasma und Kern, Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten, und es spielen diejenigen Farbstoffe, die entweder ausschließlich oder ganz vorzugsweise den Kern färben, während das Protoplasma ungefärbt bleibt oder nur einen ganz schwachen Farbenton annimmt, die sog. Kernfärbungsmittel, in der histologischen Technik eine hervorragende Rolle. Man kann die durch Färbungen erzielbare Differenzierung der Gewebe noch vermehren, wenn man Doppelfärbungen anwendet, d. h. nacheinander oder auch gleichzeitig in ein und derselben Lösung zwei verschiedene Farben einwirken läßt, die entweder verschiedene Gewebe färben, oder die, wenn es sich hauptsächlich um Zellen handelt, Protoplasma und Kern mit verschiedenen Farben hervortreten lassen.

Chemische Schlüsse lassen sich aus Färbungen nur mit großer Vorsicht ziehen. In der Theorie der Färbung stehen sich noch zwei Ansichten gegenüber, deren eine das Hauptgewicht auf chemische Vorgänge legt, während die andere das Wesentliche in physikalischen Prozessen (physikalischer Dichte, Adsorption) sieht.

Witt hat die Theorie der festen Lösungen auf die Erklärung des Färbeprozesses übertragen. Wahrscheinlich handelt es sich nur bei einem kleinen Teil unserer Färbungen um einfach chemische Prozesse (z. B. Berliner Blaureaktion), in einem anderen Teil um rein physikalische Kräfte (z. B. Löslichkeit des Sudans in Fett); in den meisten Fällen sind die Vorgänge kombiniert und können von uns bis jetzt nicht genügend analysiert werden. Deshalb müssen wir uns meist darauf beschränken, durch Färben und Entfärben morphologische Strukturen zur Darstellung zu bringen, erst in zweiter Linie chemische Differenzen aufzudecken.

Näheres über die Theorie der Färbungen siehe in Heidenhain's Artikeln „Färbungen" in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, bei A. Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas, Jena 1899; Michaelis, Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen. Berlin 1902; Pappenheim, Grundriß der Farbchemie zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten, Berlin 1900.

Für die Anwendung der Färbemittel lassen sich folgende allgemeine Grundsätze aufstellen:

1) Man verwende nur gute und erprobte Farben (zu beziehen von Dr. Grübler und Co., Leipzig), stelle die Lösungen mit peinlicher Sauber-

keit her und filtriere, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben ist, vor jedesmaligem Gebrauch. Es ist deshalb praktisch, jede Flasche für sich mit einem kleinen Glastrichter, in dem ein Filter steckt, zu verschließen. Dieses Filter kann dann für die betreffende Farblösung meist 4—6 Wochen lang gebraucht werden.

2) In der Farbflüssigkeit müssen die Schnitte möglichst ausgebreitet sein, und es dürfen nicht mehrere Schnitte fest übereinander liegen, weil sonst oft einzelne Stellen noch nicht hinreichend gefärbt sind, während andere Stellen, die ausgiebiger mit der Farblösung in Berührung gekommen sind, schon genügend oder sogar überfärbt sind. Es empfiehlt sich daher auch, die Schnitte in der Farblösung mit der Nadel oder durch Anblasen der Flüssigkeit vorsichtig hin und her zu bewegen. Sehr gut breiten sich die Schnitte aus beim Übertragen aus alkoholischen in wässerige Lösungen. Vor allem ist es aber wichtig, daß man hinreichend große Schalen und reichliche Mengen von Färbeflüssigkeit anwendet, die meist nach dem jedesmaligen Gebrauch zurückgegossen und aufbewahrt werden kann.

3) Die zur Erzielung einer guten Färbung notwendige Zeit ist keine ganz unveränderliche; sie schwankt vielmehr immer innerhalb gewisser, wenn auch meist enger Grenzen. Es ist dabei nicht nur das Alter der Färbeflüssigkeit von Einfluß, indem ältere Färbeflüssigkeiten oft schneller und intensiver färben als frisch bereitete, sondern es spielt auch die Art der Härtung und Konservierung, sowie namentlich das Alter des Präparats eine Rolle. Ältere Präparate färben sich oft langsamer und weniger intensiv als frischere. Schließlich zeigen auch die Zellen der einzelnen Organe ein etwas verschiedenes Verhalten Farbstoffen gegenüber.

Man kann aber oft auch bei schwieriger zu färbenden Objekten die Färbung erreichen:

a) durch längere Einwirkung der Farblösung bis zu 24 Stunden;

b) durch stärkere Konzentration der Farblösung;

c) durch Erwärmen der Farblösung, namentlich durch längeres Färben bei Brütofentemperatur.

d) durch Zusatz gewisser Stoffe (z. B. Säuren, Alkalien, Anilinöl usw.).

4) In manchen Fällen wird die Färbung mit einem bestimmten Farbstoff nur dadurch möglich, daß man ihr eine „Beizung“ vorausgehen läßt. Solche Beizmittel sind neben manchen anderen z. B. Alaun, Chrom, Kupfer, Eisen, Phosphormolybdänsäure. Eine indirekte Beizung wird manchmal schon durch die Art der Fixierung bewirkt (z. B. Chromlösungen).

5) Das Auswaschen der Schnitte, meist in destilliertem Wasser, muß auf das sorgfältigste und so lange vorgenommen werden, bis das Wasser keinen Farbstoff mehr annimmt. Auch nach dem Auswaschen ist es oft nützlich, die Schnitte noch mehrere Stunden lang in reichlichem destillierten Wasser zu belassen.

Oft müssen noch besondere Differenzierungsmittel angewandt werden, z. B. Alkohol, Anilinöl, Säuren, Alkalien. Sehr häufig benutzt wird Salzsäurespiritus (1 Teil offizinelle Salzsäure auf 100 Teile 70-proz. Alkohol). Die Differenzierungsflüssigkeiten müssen meist wieder gründlich aus den Schnitten entfernt werden.

## Einlegen und Konservieren der gefärbten Präparate.

1) In Glyzerin kann der Schnitt sofort aus dem destillierten Wasser übertragen werden. Man benutzt dazu entweder den Spatel oder fängt den Schnitt direkt mit dem Objektträger aus dem Wasser auf. Das überflüssige Wasser wird mit Fließpapier abgesaugt, eventuell der Schnitt mit mehrfacher Lage Fließpapier getrocknet. Dann bringt man rasch einen Tropfen Glyzerin und ein Deckglas darauf. Der Einschluß in Glyzerin wird besonders angewandt, wenn die Präparate Behandlung mit absolutem Alkohol nicht vertragen, und deshalb die Überführung in Kanadabalsam unmöglich ist. Dies gilt besonders für Fettpräparate mit Sudan oder Scharlach.

Für längere Aufbewahrung von Glyzerinpräparaten empfiehlt es sich, einen Abschluß von der Luft herzustellen und eine Verschiebung des Deckglases zu verhindern. Man kann dies erreichen:

a) durch Umrandung. Zu dem Zwecke umzieht man den Rand des Deckglases zunächst mit Wachs, indem man mit dem Docht eines eben ausgelöschten Wachslichtes über die Ränder fährt. Es hinterläßt dann der noch warme Docht, in dem sich flüssiges Wachs befindet, einen ganz schmalen Streifen von sofort erstarrendem Wachs. Wenn das Deckglas Neigung hat, sich bei dieser Prozedur zu verschieben, so kann man zunächst die vier Ecken durch Auftropfen mit dem Docht fixieren.

Bedingung für das Gelingen der Wachsumrandung ist, daß an den Rändern des Deckglases kein überschüssiges Glyzerin hervorquillt; wenn dies der Fall ist, so muß dasselbe vorher mit einem in absoluten Alkohol eingetauchten Leinwandläppchen weggewischt werden. Auch wenn während des Umziehens mit Wachs noch Glyzerin an irgend einer Stelle hervorquillt, muß dasselbe entfernt werden.

Will man die Präparate längere Zeit aufheben, so überzieht man den Wachsrand noch mit dem käuflichen Asphalt- oder mit Maskenlack. Es muß dieser den Wachsrand nach beiden Seiten überragen, derart, daß er sowohl dem Objektträger wie dem Deckglas direkt aufliegt. Der Wachsrand darf daher nur ganz schmal sein. Dagegen ist es nicht ratsam, das Deckglas direkt, ohne vorherige Wachsumrandung, mit Lack zu umziehen, weil derselbe eine Zeitlang flüssig bleibt und vermöge der Kapillarität unter das Deckglas vordringen kann.

Sehr bequem ist der Deckglaskitt nach Dr. Krönig (J. Klönne & Müller-Berlin). Der Kitt macht die vorherige Wachsumrandung überflüssig; er wird mit einem erhitzten Metallplättchen aufgetragen.

b) Durch Glyzerin-Gelatine.

Durch Leim- oder Gelatinezusatz kann man dem Glyzerin eine bei gewöhnlicher Temperatur feste Konsistenz geben. Nach Kaiser weicht man 7 g Gelatine 2 Stunden lang in 42 g destilliertem Wasser ein, setzt 50 g Glyzerin und 1 g Karbolsäure zu, erwärmt unter Umrühren 10—15 Minuten und filtriert heiß durch angefeuchtete Glaswolle. Fischler empfiehlt gewöhnliche Nährgelatine, der bei 30—35° $^1/_4$ Volumen der alten Farrant'schen Einschlußflüssigkeit (Mucilago gummi arab., Glyzerin, Solutio acidi arsenicosi conc. aa 30,0) zugesetzt sind zum Einschluß von Sudanpräparaten. Zum Gebrauch hält man die Mischung auf einem Wasserbad flüssig und bringt auf das abgetrocknete Präparat einen Tropfen.

2) In **Kali aceticum** (gesättigte Lösung). Man verfährt wie beim Einschluß in Glyzerin. Kali aceticum empfiehlt sich namentlich für Präparate, die mit Anilinfarben gefärbt sind (z. B. Amyloidreaktion), da diese in Glyzerin nach und nach ausgezogen werden und Einbettung in Kanadabalsam nicht vertragen. Auch Osmiumpräparate, durch welche Glyzerin gebräunt wird, werden in Kali aceticum eingelegt. In speziellen Fällen wendet man auch Lävulose an.

3) Der Einschluß in **Kanadabalsam,** der in Xylol gelöst ist, ist der in der pathologischen Histologie am meisten angewendete. Dazu ist es aber notwendig, daß die Schnitte erst vollkommen entwässert sind, weil sie sich sonst in dem Kanadabalsam trüben.

Die Entwässerung geschieht so, daß man den Schnitt aus dem Wasser zuerst für 3—5 Minuten in den käuflichen 96-proz. Spiritus und dann ebenso lange in absoluten Alkohol bringt, dessen Menge sich natürlich nach der Zahl der zu entwässernden Schnitte richtet. Da die Schnitte, die aus dem Wasser kommen, die Neigung haben, sich in starkem Spiritus zu kräuseln, so muß man sie in dem destillierten Wasser auf ein untergeschobenes Stückchen Fließpapier aufziehen und mit diesem in Spiritus übertragen, oder man kann — was bequemer und weniger zeitraubend ist — die Übertragung auf dem Spatel bewerkstelligen, indem man den Spatel im Alkohol unter dem Schnitt erst wegzieht, wenn derselbe etwas starr geworden ist. Etwas wird übrigens das Aufkräuseln des Schnittes auch schon dadurch verhindert, daß man denselben zunächst in 96-proz. und dann erst in absoluten Alkohol bringt und ihn hier sofort mit der Nadel ordentlich ausbreitet. Es ist diese Vorschrift entschieden mehr zu empfehlen, als direkt absoluten Alkohol anzuwenden und diesen noch einmal zu wechseln.

Bei manchen Färbungen muß absoluter Alkohol vermieden werden. In diesem Falle entwässert man die Schnitte so, daß man aus dem 96-proz. Spiritus mehrmals sorgfältg mit Fließpapier abtupft.

Da der absolute Alkohol sich nicht gut direkt mit dem Xylolkanadabalsam verbindet, so wird der Schnitt aus dem Alkohol zunächst noch für 1—3 Minuten in ein Reagens gebracht, welches einerseits sich mit dem Alkohol, andererseits aber auch gut mit dem Kanadabalsam verbindet, und welches weiterhin die zweite sehr wichtige Fähigkeit besitzt, die Präparate aufzuhellen und durchsichtiger zu machen.

Solche **Aufhellungsmittel** sind eine Reihe von ätherischen Ölen.

**Terpentinöl** wird jetzt nur noch selten angewandt. Es gibt Präparaten, die mit Berlinerblau injiziert sind, einen schönen Farbenton.

**Nelkenöl** ist vielfach im Gebrauch. Es hat den Vorteil, daß es nicht so empfindlich gegen geringste Wasserreste ist, die sich noch im Schnitt befinden. Andererseits ist es bei Celloidinpräparaten nicht anwendbar, weil es das Celloidin sofort löst. Außerdem hat es den Nachteil, daß es Anilinfarben oft auszieht oder ihnen einen schmutzigen, matten Farbenton verleiht.

Am meisten im Gebrauch ist **Origanumöl,** weil es Celloidin nicht auflöst. Auch Bergamottöl hellt gut auf und ist auch für Celloidinpräparate zu gebrauchen; ebenso Zedernholzöl und Lavendelöl.

Für Präparate, deren Kontakt mit absolutem Alkohol ganz vermieden oder auf ein Minimum reduziert werden soll, wie sehr lockere Celloidinschnitte, ferner für Anilinfarben und Bakterienschnitte, ist das

Karbolxylol (s. S. 41) sehr zu empfehlen. Man kann die Schnitte aus dem 96-proz. Alkohol in das Karbolxylol und nach einiger Zeit in reines Xylol übertragen.

Nikiforoff empfiehlt zur Erhaltung des Celloidinmantels die Entwässerung in absolutem Alkohol und Chloroform zu gleichen Teilen, d. h. den Zusatz einer wasserfreien, Celloidin nicht lösenden Flüssigkeit, welche sich mit Alkohol gut mischt.

Anilinölxylol hat ebenfalls aufhellende Eigenschaften und kommt namentlich bei Präparaten zur Anwendung, die nicht in absoluten Alkohol übertragen werden sollen, so bei der Weigert'schen Fibrin-, Bakterien- und Gliafärbung.

Gewöhnlich genügt es, die Schnitte für 2—3 Minuten in dem Aufhellungsmittel zu belassen. Durch längeres Verweilen, eine halbe bis mehrere Stunden lang, kann man aber auch dickere Schnitte noch so durchsichtig machen, daß sie ganz gut mit starker Vergrößerung untersucht werden können.

Man kann den Schnitt in einem Tropfen Öl, welchen man auf den Spatel gebracht hat, auf dem Objektträger ausbreiten. Hat man aber viele Schnitte einzulegen, so ist es bequemer, wenn man die Präparate aus dem Alkohol in eine Schale mit dem betreffenden Öl bringt und sie aus diesem dann mit dem Spatel auf den Objektträger überträgt. Dann wird das überschüssige Öl durch Fließpapier vorsichtig entfernt, und schließlich der Schnitt mit einem Tropfen Kanadabalsam bedeckt und ein Deckglas aufgelegt. Wenn der Kanadabalsam dickflüssig ist, so beschleunigt man seine gleichmäßige Verteilung dadurch, daß man den Objektträger ganz leicht über der Spiritusflamme erwärmt. Ist der Kanadabalsam dünnflüssig, so läßt man die Präparate einige Tage frei an der Luft, aber vor Staub geschützt, liegen, damit der Balsam eintrocknet.

Die verschiedenen Manipulationen, die ein zu färbender und in Kanadabalsam einzulegender Schnitt durchzumachen hat, sind also folgende:

1) Färben.
2) Auswaschen, gewöhnlich in destilliertem Wasser.
3) Übertragung auf dem Spatel in 96-proz. Spiritus, 3—5 Minuten.
4) Übertragung auf dem Spatel in absoluten Alkohol, 2—5 Minuten.
5) Übertragung in ätherisches Öl oder Karbolxylol.
6) Ausbreiten auf dem Objektträger.
7) Absaugen des überschüssigen Öls mit Fließpapier.
8) Kanadabalsam; Bedecken mit Deckglas.
9) Eventuell leichtes Erwärmen des Objektträgers.

## Die Kernfärbungen.

### A) Hämatoxylinfärbungen.

Das Hämatoxylin wird durch Extraktion aus dem Blauholz gewonnen. Es kommt in Form farbloser, an der Oberfläche durch Oxydation meist etwas brauner Kristalle in den Handel. Durch Oxydation bildet sich Hämateïn. Zur Färbung muß in dem Präparat eine Basis vorhanden sein, mit dem das Hämatoxylin eine Lackverbindung ein-

geht. Zu diesem Zwecke werden die Objekte entweder vorher gebeizt (z. B. mit Chrom-, Eisen- oder Kupferlösungen) oder man setzt der Hämatoxylinlösung selbst solche Stoffe zu (z. B. Aluminium in Form von Alaun).

Das Hämatoxylin ist eines der sichersten nnd besten Kernfärbungsmittel, und seine Anwendung paßt für die meisten Gewebe. Die Färbung der Schnitte erhält sich viele Jahre lang ganz unverändert. Die Kerne zeigen eine intensiv blaue oder mehr violette Färbung, das Protoplasma dagegen nur einen ganz blaßbläulichen Farbenton.

**1) Hämatoxylinalaun:**

Bereitung: Die käuflichen Hämatoxylinkristalle werden in einer geringen Menge absoluten Alkohols gelöst. Am besten ist es, wenn die Lösung ganz konzentriert ist und noch Kristalle im Überschuß enthält. Von dieser Lösung setzt man zu einer 1-proz. wässerigen Alaunlösung so viel zu, bis dieselbe ein hellblaues bis hellviolettes Aussehen hat. Darauf setzt man die Lösung offen dem Licht aus, wo sie unter der Einwirkung des Sauerstoffs in einigen Tagen eine gesättigte blaue Farbe annimmt. Dann ist sie zur Färbung geeignet. Als Maßstab für die Quantität der zuzufügenden alkoholischen Hämatoxylinlösung kann dienen, daß eine gut färbende Hämatoxylinalaunlösung etwa $^1/_2$—$^3/_4$ Proz. reines Hämatoxylin enthalten muß. Da die Lösung um so intensiver färbt, je älter sie wird, so ist es empfehlenswert, sie nach einigen Wochen noch durch Zusatz von Alaunwasser weiter zu verdünnen. Hansen empfiehlt zur Oxydation und zum sofortigen Eintritt der Färbekraft auf je 200 ccm Hämatoxylinalaunlösung 2 ccm einer bei 15° C konzentrierten wässerigen Lösung von Kalium permang. unter Erwärmung bis zum Sieden zuzusetzen. Auch Hämatein kann zur Herstellung von sofort farbkräftigen Lösungen benutzt werden.

Anwendung.

1) Färben 1—2—3 Minuten lang in gut filtrierter Lösung.
2) Auswaschen in reichlichem destilliertem Wasser.
3) In destilliertem Wasser 12—24 Stunden lang stehen lassen.
4) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Wenn die Hämatoxylinlösung noch frisch ist, so färben sich die Schnitte langsam; sie dunkeln aber, worauf immer Rücksicht zu nehmen ist, in Wasser stark nach. Wenn die Lösung älter ist, so färbt sie meist schon in 1, oft sogar schon in $^1/_2$ Minute, und es empfiehlt sich deshalb, den Effekt der Färbung dadurch zu kontrollieren, daß man in kurzen Zwischenräumen einen Schnitt in destilliertes Wasser bringt, um zu sehen, wie stark die Färbung geworden ist. Zur vorläufigen Orientierung kann man einen Schnitt sofort nach dem Auswaschen in Glyzerin oder nach vorheriger Entwässerung in einen Tropfen Nelkenöl bringen und untersuchen. Wenn es aber die Zeit irgendwie erlaubt, so muß man die Schnitte, nachdem sie sorgfältig ausgewaschen sind, noch wenigstens 12 Stunden im Wasser lassen. Durch das Auswässern wird die Farbe fixiert, während sonst die Schnitte oft noch, wenn sie schon in Kanadabalsam eingebettet sind, nachdunkeln.

Sind die Schnitte in der Farblösung zu dunkel geworden, was namentlich bei älteren Lösungen vorkommen kann, so läßt sich ein

Teil der Farbe dadurch wieder entfernen, daß man sie für eine bis mehrere Stunden in 1-proz. wässerige Alaunlösung zurückbringt. Danach ist es aber unbedingt notwendig, die Schnitte wenigstens 12 Stunden in destilliertem Wasser zu belassen.

Eine andere Methode der **Differenzierung** geschieht mit 70-proz. Alkohol, dem 1-proz. Salzsäure zugesetzt ist; bei Sudan- oder Scharlachpräparaten nimmt man besser nur 50-proz. Alkohol. Man kann die Schnitte direkt aus der Hämatoxylinlösung in den salzsauren Alkohol bringen; die Schnitte geben reichlich Farbstoff ab und werden ganz hellrötlich; die Zeit bemißt sich nach der Stärke der Färbung. Mit Vorteil kann man denselben Salzsäure-Alkohol, der schließlich eine rotbraune Farbe erhält, häufig benutzen. Sodann muß die Säure gründlich entfernt werden, wozu längerer Aufenthalt in Leitungswasser, das an und für sich schon alkalisch ist, genügt. Beschleunigen kann man letztere Prozedur durch geringen Zusatz von Ammoniak oder Lithiumkarbonat; die Präparate bekommen eine sehr schön blaue Farbe und zeigen eine distinkte Kernfärbung. Nach einigem Verweilen in Wasser kann sofort Eosinfärbung angeschlossen werden.

Zu Doppelfärbungen eignet sich vor allem Eosin (s. S. 59), dann auch Pikrinsäure (s. S. 60), durch welche man außerdem leicht eine Entfärbung zu stark gefärbter Präparate bewirken kann. Da die Pikrinsäure sehr stark und sehr rasch entfärbt, so müssen Präparate, die mit ihr grundiert werden sollen, immer stark in Hämatoxylin vorgefärbt werden. Van Gieson-Färbung s. S. 60.

Das Zurückbleiben von Säure muß bei Hämatoxylinpräparaten sorgfältig vermieden werden.

Die Hämatoxylinalaunlösung hat eine verschieden lange Haltbarkeit, bis zu $^1/_2$ Jahr. Wenn ihr Farbenton ins Rötliche übergeht, ist sie nicht mehr brauchbar und muß dann frisch bereitet werden.

Eine ähnliche Lösung ist das

### 2) Alaunhämatoxylin nach Delafield.

Zu 400 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniakalaun (1 Teil löst sich in etwa 11 Teilen Wasser) setzt man eine Lösung von 4 g Hämatoxylin in 25 ccm absolutem Alkohol und läßt das Gemisch in einer offenen Flasche 3—4 Tage stehen. Dann filtriert man, gibt 100 ccm Glyzerin und ebensoviel Methylalkohol hinzu, filtriert wieder, läßt das Gemisch wenigstens zwei Monate offen stehen und schließt nun erst die Flasche. Zum Färben verdünnt man es mit viel Wasser. Differenzierung wie oben.

### 3) Hämalaun nach P. Mayer.

1 g Hämatein (aus Hämatoxylin durch Oxydation gewonnen) oder Hämateinammoniak wird durch Erwärmen in 50 ccm Alkohol von 90 Proz. gelöst und zu einer Lösung von 50 g Alaun in 1000 ccm destillierten Wassers gegossen. Nach dem Erkalten wird eventuell filtriert. Man kann auch noch 2 Proz. Eisessig hinzusetzen. Die Lösung ist sofort gebrauchsfertig, aber auch nicht unbegrenzt haltbar. Nach der Färbung gründliches Wässern in Leitungswasser.

**Ehrlich's saures Hämatoxylin.**

Bereitung:

| | | |
|---|---|---|
| Hämatoxylin | 2,0 | |
| Alkohol absolut. | 60,0 | |
| Der Lösung hinzuzufügen: | | |
| Glyzerin | 60,0 | mit Alaun gesättigt. |
| destilliertes Wasser | 60,0 | |
| Eisessig | 3,0 | |

Anwendung:

1) Färben 4—5 Minuten lang.
2) Auswaschen in Wasser.
3) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Die Ehrlich'sche Hämatoxylinlösung wird ebenfalls zunächst 2—3 Wochen dem Lichte ausgesetzt und dann filtriert. Sie überfärbt nicht leicht und ist sehr haltbar.

**5) Chromhämatoxylinfärbung nach R. Heidenhain.**

1) Färben 24—28 Stunden lang in einer einfach wässerigen, in der Wärme hergestellten 0,5—1-proz. Hämatoxylinlösung.
2) Direkte Übertragung in eine $^1/_3$-proz. wässerige Lösung von einfach chromsaurem Kali 24—28 Stunden lang. Diese Lösung muß mehrmals gewechselt werden, bis keine Farbstoffwolken mehr abgehen.
3) Sehr sorgfältiges Auswaschen in Wasser.

Die Methode gibt sehr scharfe Bilder und eignet sich namentlich auch zum Durchfärben ganzer Stücke, die dann nach dem Auswaschen mit Wasser in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet und schließlich eingebettet werden. Die Präparate erscheinen dunkelschwarz, die Schnitte dürfen daher nicht zu dick sein.

Apathy empfiehlt alkoholische Kalibichromatlösung (1 Teil 5-proz. wässeriger Lösung wird unmittelbar vor dem Gebrauch mit 4 Teilen 80—90-proz. Alkohol gemischt). Auswaschen in 70-proz. Alkohol im Dunkeln. Sonst ist das Verfahren dasselbe wie bei der Heidenhain-schen Methode.

**6) Eisenhämatoxylinfärbung nach Benda.**

Die Schnitte kommen für 24 Stunden in liquor ferri sulfurici der Pharmakopoe, der mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt ist, werden dann zunächst mit destilliertem und darauf mit Leitungswasser gut ausgewaschen und in eine 1-proz. wässerige Hämatoxylinlösung übertragen. Die ganz schwarz gefärbten Schnitte werden in Wasser gewaschen und in dünner Essigsäure (5—30 Proz.) oder stark verdünntem liquor ferri sulfurici (1:20) differenziert.

**7) Eisenhämatoxylinfärbung nach M. Heidenhain.**

1) Härtung in Sublimat, Aufkleben der Schnitte auf dem Objektträger mit destilliertem Wasser, Behandlung mit jodhaltigem Alkohol zur Entfernung des Quecksilbers. Auch Härtung in 10-proz. Formol gibt gute Resultate. Eventuell Vorfärbung mit Bordeaux-R.

2) Beizung in $2^1/_2$-proz. Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammonium 3—12 Stunden lang. Man stellt den Objektträger senkrecht in die Lösung, damit etwaige Niederschläge nicht auf den Schnitt fallen.
3) Gründliches Abspülen in destilliertem Wasser.
4) Färben 24—36 Stunden in nicht zu frischer, 4—6 Wochen alter $^1/_2$-proz. wässeriger Hämatoxylinlösung, ebenfalls mit senkrechter Stellung des Objektträgers. Es empfiehlt sich, immer dieselbe Farblösung zu gebrauchen. Frische Hämatoxylinlösung erhält Färbekraft, wenn man sie mit etwas Beize versetzt, in der Menge, daß kein nennenswerter Niederschlag entsteht.
5) Abschwenken in Leitungswasser.
6) Zurückverbringen in die Eisenoxydammoniumlösung; Entfärbung unter Kontrolle des Mikroskops (Wasserimmersion), bis das Zellprotoplasma entfärbt ist, unter öfterem Abschwenken in Leitungswasser.
7) Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. (Keine ätherischen Öle!)

**8) Eisenhämatoxylin nach Weigert.**

Hierbei wird das Eisen der Farblösung selbst zugesetzt. Durch Salzsäure wird Überfärbung vermieden. Man bereitet sich folgende zwei Lösungen (unbegrenzt haltbar)

a) 1-proz. Lösung von Hämatoxylin in 96-proz. Alkohol, die man dem Lichte ausgesetzt läßt.
b) Liquor ferri sesquichlorati 4,0
Aqu. destill. 95,0
Acid. hydrochlor. (Deutsches Arzneibuch) 1,0.

Zum Gebrauch mischt man gleiche Teile von a) und b), wodurch eine tiefschwarze nicht haltbare Lösung entsteht. Man färbt einige Minuten oder länger. Danach Abspülen in Wasser.

Die Färbung ist besonders geeignet zur Vorfärbung bei der van Gieson-Methode (s. S. 61).

**9) Kupferhämatoxylinfärbung nach Benda.**

1) Übertragen der Schnitte von Material, das in Flemming'schem Gemisch gehärtet ist, in eine konzentrierte Lösung von Cuprum aceticum, 24 Stunden lang bei Brütofentemperatur.
2) Gründliches Auswaschen.
3) Färben in 1-proz. wässeriger Hämatoxylinlösung, bis die Schnitte schwarz sind.
4) Entfärben in Salzsäure 1 : 500, bis die Schnitte gelb sind.
5) Neutralisieren der Säure in gesättigter Cuprum-aceticum-Lösung.
6) Auswaschen.
7) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Die Hämatoxylinfärbungen der Markscheiden siehe bei Zentralnervensystem.

## B. Karminfärbungen.

**1) Alaunkarmin.**

Bereitung: 5 g Kalialaun werden in 100 ccm destilliertem Wasser durch Erwärmen gelöst. Nach vollkommenem Erkalten wird

die Lösung filtriert und dann 1 g Karmin zugesetzt und durch Kochen in Lösung gebracht. Schridde empfiehlt, immer gleich eine Menge von 2000 ccm herzustellen und genau 20 Minuten zu kochen. Nach dem Kochen vollkommen erkalten lassen und sorgfältig filtrieren.

Anwendung:

1) Färben 10 Minuten bis 2 Stunden lang.
2) Auswaschen in Wasser.
3) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Die Kerne werden durch Alaunkarmin schön violettrot gefärbt. Dabei tritt, was gegenüber der Hämatoxylinlösung von Vorteil ist, keine Überfärbung ein, auch wenn die Schnitte mehrere Stunden lang in der Farbe liegen. Das Auswaschen erfordert nicht soviel Zeit wie bei der Hämatoxylinlösung und die Farbe ist schließlich nicht so empfindlich gegen Säure. Für schwer färbbare Objekte ist sie dagegen nicht zu empfehlen.

### 2) Lithionkarmin.

Bereitung: Karmin 2,5—5,0 werden in gesättigter wässeriger Lösung von Lithion carbonicum 100,0 aufgekocht und filtriert.

Anwendung:

1) Färben 2—3 Minuten lang.
2) Auswaschen $^1/_2$—1 Minute lang in Salzsäurespiritus = konz. Salzsäure 1,0 + 70-proz. Alkohol 100,0.
3) Entsäuern in reichlichem destilliertem Wasser.
4) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Die Lithionkarminfärbung verleiht dem Kern eine intensiv rote Farbe. Sie ist ein sehr sicheres Kernfärbemittel, welches auch bei schwer färbbaren Objekten schnell und sicher wirkt. Handelt es sich übrigens um solche, so kann man den Karmingehalt der Lösung bis auf 5 Proz. steigern und die Farbe bis zu 12 Stunden einwirken lassen. Ein weiterer Vorteil besteht in der sehr einfachen Zubereitungsweise. Eine Überfärbung ist nicht möglich, weil man durch längeres Auswaschen in Salzsäurespiritus beliebig viel Farbe ausziehen kann. Andererseits muß bei der Wahl dieser Färbung immer die Anwendung der Salzsäure mit in den Kauf genommen werden. Die Lithionkarminfärbung eignet sich auch gut für Präparate, die mit einer blauen Injektionsmasse injiziert sind, sowie als Gegenfärbung bei der Gram'schen oder Weigert'schen Bakterienfärbung.

### 3) Boraxkarmin.

Bereitung: Karmin 0,5
Borax 2,0
Aqua destillata 100,0
gemischt und bis zum Kochen erwärmt. Unter fortwährendem Umrühren wird zugesetzt
Acid. acetic. dilut. (Pharm. Germ.) 4,5.
Dann 24 Stuuden stehen lassen und filtrieren.

Anwendung:

1) Färben 5—15 Minuten lang.

2) $^1/_2$—1 Minute lang Auswaschen in Salzsäurespiritus [Salzs. 1, Spiritus (70-proz.) 100].
3) Gründliches Entsäuern in Wasser.
4) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Boraxkarmin gibt eine ähnliche Färbung wie Lithionkarmin; die Farbe ist aber nicht ganz so intensiv.

**4) Pikrokarmin.**

Bereitung: Karmin 1,0
Liquor Ammon. caust. 5,0
Aqua destillata 50,0
Nach erfolgter Lösung zugesetzt:
Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 50,0.

Man läßt die Farbflüssigkeit in einem weit offenen Gefäß stehen, bis alles Ammoniak verdunstet ist. Dann filtriert man.

Anwendung:

1) Färben eine Stunde lang.
2) Auswaschen $^1/_2$ Stunde lang in 1-proz. Salzsäureglyzerin, das durch Pikrinsäurezusatz leicht gefärbt ist.
3) Auswaschen 5 Minuten lang in Wasser, das durch Pikrinsäure leicht gelb gefärbt ist.
4) Entwässern in durch Pikrinsäure gelb gefärbtem Alkohol.
5) Öl — Kanadabalsam.

Die Pikrokarminlösung hat, wenn man in der angegebenen Weise verfährt, und dem Glyzerin, Wasser und Alkohol etwas Pikrinsäure zusetzt, den Vorteil, daß sie eine haltbare Doppelfärbung gibt, indem die Kerne braunrot erscheinen, während das Protoplasma gelb gefärbt wird; die Färbung gelingt aber nicht immer gut. Eine weitere Eigenschaft besteht darin, daß auch hyalin und kolloid degenerierte Gewebe einen intensiv gelben Farbenton annehmen. Auch das Protoplasma der quergestreiften Muskeln und Hornsubstanz treten durch ihre deutliche Gelbfärbung stark hervor. Alle diese Vorzüge besitzt die VAN GIESON'sche Färbung aber in noch höherem Grade und ist dabei in der Wirkung viel sicherer.

Zu bemerken ist noch, daß die von Dr. GRÜBLER in Leipzig bezogene WEIGERT'sche Pikrokarminlösung sehr zuverlässig wirkt.

**5) Pikrolithionkarmin.**

Bereitung: Zu der oben angegebenen (S. 54) Lithionkarminlösung werden 2 Teile gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung hinzugesetzt.

Anwendung: Wie bei Pikrokarmin.

Pikrolithionkarmin gibt eine ganz ähnliche Färbung wie Pikrokarmin.

**6) BEALE's Karmin.**

Bereitung: Karmin 0,6
Liquor Ammon. caust. 3,75
Einige Minuten gekocht, dann zugesetzt:
Glyzerin 60,0

| | |
|---|---|
| Aqu. destillata | 60,0 |
| Alkohol | 15,0 |

Anwendung: Die Beale'sche Karminlösung wird vorzugsweise zur Durchfärbung ganzer Stücke angewandt. Zu dem Zwecke müssen die Stücke je nach ihrer Dicke 2—8 Tage in der Lösung verbleiben, danach werden sie in Wasser ausgewaschen, kommen zur Nachhärtung in Alkohol und werden dann eingebettet. Die einzelnen Schnitte können später sofort eingelegt werden.

### 7) P. Mayer's alkoholisches Salzsäurekarmin.

Bereitung: 4 g Karmin werden in 15 ccm Wasser und 30 Tropfen Salzsäure durch Kochen gelöst; dann fügt man 95 ccm Alkohol von 85 Proz. hinzu, filtriert heiß, neutralisiert mit Ammoniak, bis ein bleibender Niederschlag gerade entstehen will und filtriert nach dem Erkalten event. nochmals.

Anwendung: Färbung einige Minuten. Auswaschen in Alkohol von 80—90 Proz.; wenn man reine Kernfärbung haben will, muß man diesem etwas Salzsäure zusetzen.

Diese Lösung kann von Nutzen sein, wenn man den Kontakt der Schnitte mit Wasser vermeiden will. Gegenfärbung ist möglich mit einer schwachen Lösung von Pikrinsäure in Benzol.

## C. Anilinfarben.

### 1) Bismarckbraun (Vesuvin).

Bereitung:

a) Entweder gesättigte wässerige, durch Kochen dargestellte Lösung = 3—4-proz., filtriert.
b) Oder konzentrierte alkoholische Lösung in 40-proz. Alkohol = $1^1/_2$—2-proz.

Anwendung:

1) Färben 5 Minuten lang.
2) Auswaschen in starkem Spiritus.
3) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Das Bismarckbraun verleiht den Kernen eine schöne braune Farbe. Sind Bakterien in dem Gewebe vorhanden, so werden diese noch intensiver braun gefärbt. Das Protoplasma erhält einen hellbräunlichen Farbenton. Die wässerige und alkoholische Lösung wirken in gleicher Weise. Eine Überfärbung tritt nicht ein. Die mit Bismarckbraun gefärbten Präparate eignen sich besonders gut für die photographische Reproduktion. Man kann statt in starkem Spiritus auch in Salzsäurespiritus (1-proz.) auswaschen.

Außer dem Bismarckbraun sind nur wenige Anilinfarben als Kernfärbemittel im Gebrauch, obschon die meisten als solche verwandt werden können. Sie färben an und für sich diffus; die Differenzierung der Kerne tritt erst durch Auswaschen in absolutem Alkohol ein. Die Färbung ist nicht so haltbar, wie die durch Hämatoxylin und die verschiedenen Karminlösungen bewirkte. Empfehlenswert sind unter den Kernfärbungen mit Anilinfarben noch die mit Gentianaviolett, Safranin,

und die Heidenhain-Biondi'sche Färbung, die der Ehrlich'schen Blutfärbung nachgebildet ist. Dieselbe ist aber nicht haltbar.

**2) Gentianaviolett.**

Bereitung: 1-proz. wässerige oder 1—2-proz. alkohol. Lösung.

Anwendung:

1) Färben 3—5 Minuten lang.
2) Auswaschen in Alkohol, bis der Schnitt eine hellblaue Farbe hat.
3) Absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Oft wird die Kernfärbung noch deutlicher, wenn man den Schnitt aus der Farbe zunächst höchstens für $^1/_2$ Minute in eine $^1/_2$-proz. wässerige Essigsäurelösung bringt und dann erst in Spiritus auswäscht.

**3) Kresylviolett.**

Bereitung: Konzentrierte wässerige Lösung von Kresylviolett „R. extra" (Chemische Fabrik Mülheim a. M.).

Anwendung:

1) Färben 5—10 Minuten lang.
2) Differenzierung in 70-proz. Alkohol, bis keine blauen Wolken mehr abgehen.
3) 93-proz. Alkohol, Cajeputöl oder Karbolxylol, Xylol, Balsam.

**4) Safranin.**

1) $^1/_2$—24 Stunden lang Färbung der Schnitte in 1-proz. wässeriger Safraninlösung.
2) Ganz kurzes Abspülen in Wasser.
3) Auswaschen in absolutem Alkohol, der durch wenige Tropfen Salzsäurespiritus (1-proz.) ganz leicht angesäuert ist. Man gibt zu einer mittelgroßen Schale mit Alkohol 5—10 Tropfen Salzsäurespiritus (s. S. 46).
4) Auswaschen in reinem absolutem Alkohol, bis die Schnitte hellbraunrot aussehen.
5) Öl, Kanadabalsam.

Die Färbung wird besonders gebraucht zur Darstellung der Kernteilungsfiguren nach Fixierung in Flemming'schem Gemisch.

**5) Biondi-Heidenhain's Färbung.**

| | | |
|---|---|---|
| Bereitung: | Gesättigte wässerige Orangelösung filtriert | 100 ccm |
| | Gesättigte Säure-Fuchsinlösung | 20 „ |
| | Gesättigte Methylgrünlösung | 50 „ |

Zur Darstellung der einzelnen gesättigten Lösungen ist es notwendig, daß man dieselben mit einem Überschuß von Farbstoff mehrere Tage stehen läßt. Die Lösung wird zur Färbung im Verhältnis 1 : 100 verdünnt und muß dann durch Essigsäurezusatz deutlich stärker rot werden. Auf Fließpapier muß sie einen Fleck machen, der in der Mitte blaugrün, nach den Rändern zu aber orange erscheint. Wird die orangefarbige Zone von einer breiteren roten umgeben, so enthält die Lösung zu viel Fuchsin. Wenn ältere Lösungen an Färbekraft

eingebüßt haben, so kann man oft dieselbe dadurch wiederherstellen, daß man eine ganz minimale Menge von Essigsäure zugibt. Man taucht einen Glasstab in Essigsäure, schwenkt ihn in der Luft einige Male hin und her und bringt dann den noch anhaftenden Rest von Säure zu der Farblösung.

Am besten bezieht man die nach den Angaben von Heidenhain hergestellte Lösung von Dr. Grübler in Leipzig.

Anwendung:

1) Härtung in Sublimat (s. S. 17).
2) Färbung 6—24 Stunden lang in der verdünnten Lösung.
3) Kurzes Auswachsen in 90-proz. Alkohol.
4) Entwässern in absolutem Alkohol.
5) Xylol, Kanadabalsam.

In Teilung begriffene Kerne, sowie die fragmentierten Kerne der Leukocyten sind intensiv grünviolett, die ruhenden Kerne blau gefärbt, die roten Blutkörperchen rot.

Die Methode eignet sich namentlich sehr gut für Präparate, die viele Leukocyten enthalten. Sie ist ursprünglich nur für Paraffinschnitte und für Färbungen auf dem Objektträger angegeben. Man kann aber auch einzelne Celloidinschnitte, ohne sie auf dem Objektträger zu fixieren, in der Lösung färben. Wenn die Schnitte sehr dünn sind, braucht man das Celloidin nicht vorher zu entfernen. Bei dickeren Schnitten wirkt dagegen seine Gegenwart störend, weil es sich nur teilweise entfärbt.

Für drüsige Organe empfiehlt Nikiforoff ganz besonders die von Ehrlich für Färbung der eosinophilen Zellen angegebene Farbenmischung:

| | |
|---|---|
| Aurantia | |
| Indulin | |
| Eosin ana | 2,0 |
| Glyzerin | 30,0. |

Die Stücke werden in Sublimat gehärtet; in Paraffin eingebettet; die Schnitte werden auf dem Objektträger gefärbt.

## Diffuse Färbungen und Doppelfärbungen.

Unter den Farben, welche die Grundsubstanz der Gewebe färben, sind namentlich das neutrale karminsaure Ammoniak, welches kurzweg als neutrales Karmin bezeichnet wird, und das Eosin zu nennen. Letzteres kommt sowohl in wässeriger wie in alkoholischer Lösung zur Anwendung. Man macht jedoch selten von einer isolierten diffusen Färbung der Gewebe Gebrauch. Dieselbe wird vielmehr meist als Doppelfärbung in Verbindung mit einem Kernfärbemittel, vor allem mit Hämatoxylin angewandt.

### Neutrales Karmin.

Bereitung: 5 g Karminpulver werden mit etwas überschüssigem Ammoniak zu einem roten Brei verrieben, dann mit 200 g Wasser in einem offenen Kolben so lange gekocht, bis das Ammoniak verflüchtigt ist. Der Kolben bleibt offen stehen, bis er nach einigen Wochen einen roten Bodensatz zeigt. Dann wird filtriert. Die Flüssigkeit färbt mit

zunehmendem Alter immer besser. Man filtriert daher die gebrauchte Lösung immer wieder zurück.

Honegger empfiehlt folgende Bereitungsweise, durch welche die Flüssigkeit sofort färbekräftig werden soll: das Karminpulver wird mit nur soviel Ammoniak, als unumgänglich notwendig ist, zu einem dicken Brei verrieben, dann an der Wand der Reibschale dünn verteilt, und dem Austrocknen überlassen; die so erhaltene Masse wird fein pulverisiert, noch etwa 24 Stunden lang der Luft ausgesetzt und dann in kaltem Wasser gelöst.

Anwendung: Von der konzentrierten Farbflüssigkeit stellt man sich durch Einträufeln in Wasser eine hellrote Lösung dar und färbt in dieser, bis die Schnitte eine deutlich rote Farbe bekommen haben. Die Färbung gelingt am besten, wenn man die Schnitte lange Zeit, bis 12 Stunden, in einer sehr verdünnten Lösung liegen läßt. Bei Mangel an Zeit kann man die Färbung aber auch in einer konzentrierten Lösung bewirken, in welcher der hinreichende Farbenton gewöhnlich in 20—30 Minuten erreicht wird.

Danach wird gründlich in Wasser ausgewaschen.

Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Karmin wird stets in der Weise vorgenommen, daß man zuerst mit Hämatoxylin und dann mit Karmin färbt. Nach der Hämatoxylinfärbung müssen die Schnitte mindestens 6, besser noch 12 Stunden ausgewässert werden. Dann erst wird in Karmin 'gefärbt und nochmals in Wasser sorgfältig ausgewaschen.

**Eosin,** wässerige Lösung.

Bereitung: Von einer konzentrierten wässerigen oder spirituösen Lösung von Eosin tropft man so viel in eine Schale mit Wasser, daß eine hellrote Färbung entsteht, die etwa 1 : 1000—1500 Eosin enthält.

Anwendung:

1) Färben, wenige Minuten, bis die Schnitte eine rote Farbe haben.
2) Abspülen in Wasser.
3) Entwässern in Alkohol; nicht länger, als notwendig ist, weil der Alkohol das Eosin nach und nach wieder auszieht.
4) Öl (kein Bergamottöl) oder Xylol, Kanadabalsam.

**Eosin,** alkoholische Lösung.

Bereitung: Von einer konzentrierten alkoholischen Lösung von Eosin wird tropfenweise so viel in 96-proz. Spiritus oder in absoluten Alkohol gegeben, bis derselbe eine rosarote Farbe angenommen hat.

Anwendung:

1) Färbung der vorher in 96-proz. Spiritus übertragenen meist schon mit Hämatoxylin vorgefärbten Schnitte einige Minuten bis mehrere Stunden lang.
2) Auswaschen in 96-proz. Spiritus, bis der gewünschte Farbenton vorhanden ist.
3) Alkohol, Öl, Kanadabalsam.

Die Zeit, in welcher die Eosinfärbung zustande kommt, ist sehr verschieden, so daß sich in dieser Beziehung bestimmte Regeln kaum

geben lassen; manchmal ist eine Einwirkung der Farblösung bis 14 Stunden lang zweckmäßig.

Die alkoholische Lösung des Eosins färbt gleichmäßiger als die wässerige. Eosin färbt die roten Blutkörperchen rosarot bis kupferrot, namentlich in Präparaten, die in Formalin oder auch in Sublimat gehärtet sind. Der Gefäßinhalt tritt deshalb an Eosinpräparaten besonders deutlich hervor. Außerdem gibt es den Geweben eine diffus rote Färbung. Das Eosin kommt deshalb für sich allein selten zur Anwendung; meist wird es bei Doppelfärbungen gebraucht, und zwar eignet es sich vor allem zu Kombinationen mit Hämatoxylin, dann auch mit Alaunkarmin. Auch zusammen mit Gentianaviolett kann es angewendet werden. Die Doppelfärbungen mit Eosin werden ebenfalls so ausgeführt, daß zuerst das Kernfärbungsmittel einwirkt und dann erst die Eosinlösung. Man tropft dann zu dem absoluten Alkohol, in dem die mit Hämatoxylin usw. gefärbten Präparate entwässert werden, das entsprechende Quantum alkoholischer Eosinlösung hinzu und wäscht noch einmal in reinem Alkohol aus. Manche nehmen auch die Färbung mit Eosin so vor, daß sie dem zur Aufhellung bestimmten Nelken- oder Origanumöl etwas Eosin zusetzen. Oft nimmt auch in unerwünschter Weise das Nelkenöl, wenn man viele Eosinpräparate in demselben aufgehellt hat, von selbst eine Eosinfärbung an, die sich dann allen weiteren Präparaten mitteilt.

Man hat auch zu Hämatoxylinlösungen direkt Eosin zugesetzt, um in ein und derselben Lösung die Doppelfärbung zu erzielen. So kann man z. B. zu der Ehrlich'schen Hämatoxylinlösung (siehe S. 52) 0,5 Eosin zusetzen, um diesen Effekt zu erreichen. Es hat das Verfahren jedoch keine Vorteile vor der getrennten Färbung in Hämatoxylin und Eosin.

Von der Eigenschaft der **Pikrinsäure**, in wässeriger Lösung eine diffuse Färbung der Gewebe zu bewirken, macht man bei der oben angeführten Pikrokarminfärbung (s. S. 55) und bei der Färbung mit Pikrolithionkarmin (s. S. 55) Gebrauch. Auch kann man die Schnitte in einer kernfärbenden Karminlösung vorfärben und sie dann in einer 1—5-proz. wässerigen Lösung von Pikrinsäure nachfärben. Auch mit Hämatoxylin und Pikrinsäure läßt sich eine gute Doppelfärbung erzielen; man muß mit Hämatoxylin stark vorfärben, weil die Pikrinsäure zum Teil entfärbend wirkt.

### Van Gieson'sche Färbung.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit, Alkohol, Formalin usw.
2) Färben $^1/_2$ Stunde lang (oft auch länger) in Hämatoxylin.
3) Gründliches Auswaschen in Wasser.
4) Färben 3—5 Minuten lang in einer Lösung von Pikrinsäure, gesättigte wässerige Lösung, Säurefuchsin, gesättigte wässerige Lösung so viel, daß die Mischung eine tiefrote Farbe erhält.
5) Abspülen in Wasser, $^1/_2$ Minute lang.
6) Spiritus, Alkohol, Öl oder Xylol, Kanadabalsam.

Die Methode ist sehr bequem zu handhaben und gibt eine sehr schöne Doppelfärbung. Die Kerne werden braunrot, das Zwischengewebe leuchtend rot in verschiedenen Nuancen. Für viele Untersuchungen,

namentlich vergleichende, ist es zweckmäßig, mit Lösungen von verschiedenem Fuchsingehalt zu färben.

Ein weiterer Vorteil ist die gleichzeitige Färbung von Amyloid, Colloid, Hyalin und Schleim.

Van Gieson hat ursprünglich die Hämatoxylinlösung von Delafield empfohlen. Die gewöhnliche Alaunhämatoxylinlösung gibt aber ebenso gute Resultate. Man überfärbt die Schnitte, weil die Pikrinsäure zum Teil eine entfärbende Wirkung ausübt. Falls die Entfärbung nicht genügt, kann man sie in gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung fortsetzen.

Am meisten zu empfehlen ist die Weigert'sche Modifikation der van Gieson-Färbung.

1) Färbung in Weigert'schem Eisenhämatoxylin (s. S. 53).
2) Abspülen in Wasser.
3) Kurzes Färben in einem Gemisch von filtrierter, bei Zimmertemperatur gesättigter Pikrinsäurelösung 100 ccm und 1% wässeriger Säurefuchsinlösung 10 ccm.
4) Kurzes Abspülen in Wasser.
5) 96-proz. Spiritus — Alkohol absolutus (nicht zu lange!) Karbolxylol, Xylol, Balsam.

## Durchfärbung ganzer Stücke.

Eine besondere Art der Färbung besteht darin, daß man nicht einzelne Schnitte, sondern das ganze zu untersuchende Stückchen in toto färbt. Man wählt dazu mit Vorliebe Farbstofflösungen, denen ein Quantum Alkohol zugesetzt ist, z. B. die Beale'sche Karminlösung (s. S. 55). Auch das Heidenhain'sche Hämatoxylin (s. S. 52 Nr. 5) und Bismarckbraun (s. S. 56) eignen sich zum Durchfärben ganzer Stücke.

Als Regeln für eine derartige Durchfärbung ganzer Stückchen sind zu beachten:

1) Die betreffenden gehärteten oder fixierten Stückchen dürfen nicht zu voluminös sein, weil sonst die Farblösung zu schwer eindringt.

2) Die Färbung muß viel länger als bei der Schnittfärbung, 1—3—4—8 Tage lang, einwirken.

3) Gründliches Auswaschen, bis keine Farbe mehr abgeht.

4) Nachhärtung in 96-proz. Spiritus, resp. in absolutem Alkohol, bis das Objekt schnittfähig ist.

Die Durchfärbung ganzer Stücke hat den Vorteil, daß sie bequemer und viel weniger zeitraubend ist als die Färbung einzelner Schnitte. Außerdem ist sie schonender, weil mit dem einzelnen Schnitt, der sofort eingelegt werden kann, nicht mehr so viele Manipulationen vorgenommen zu werden brauchen. Trotzdem kommt das Verfahren, das in der normalen Histologie eine ausgedehnte Anwendung findet, für die Untersuchung pathologisch-anatomischer Präparate viel seltener in Betracht, weil wir uns meist nicht mit einer Färbmethode begnügen dürfen. Für Schnittserien und Anfertigung zahlreicher Kurspräparate bedient man sich aber mit Vorteil der Stückfärbung, umsomehr als eine Reihe von anderen Färbungen (Gram'sche und Weigert'sche Bakterienfärbung, Elasticadarstellung, van Gieson-Färbung) sich auch noch nachträglich an den einzelnen Schnitten ausführen lassen.

Am meisten zu empfehlen ist für diese Zwecke die

Gleichzeitige Fixierung und Durchfärbung nach Schridde.

1) 4—5 mm dicke Gewebsstücke von möglichst frischem Material kommen für 3—4 Tage in

| | |
|---|---|
| Alaunkarmin | 9 Teile |
| Formalin (40-proz.) | 1 Teil. |

2) Hierauf werden die Stücke sorgfältig 12—24 Stunden in fließendem Wasser gewaschen und kommen

3) für 12 Stunden in jedesmal erneuerten

| | |
|---|---|
| 75-proz. Alkohol | 200 Teile |
| 25-proz. Ammoniaklösung | 1 Teil |

zur Entfernung von Formolniederschlägen. Bei sehr blutreichen Organen kann man doppelt so viel Ammoniak nehmen.

4) 6 Stunden in 96-proz. Alkohol, 6—12 Stunden in absoluten Alkohol, Toluol, Paraffineinbettung.

---

Neuntes Kapitel.

# Färbung besonderer Substanzen in gesunden und kranken Zellen und Geweben.

## A. Darstellung der Kernteilungsfiguren.

Die Darstellung der Kernteilungsfiguren erfordert eine besondere Technik, deren Eigentümlichkeiten sowohl die Art der Konservierung, wie die Methode der Färbung betreffen.

Erster Grundsatz ist, daß die zu untersuchenden Stückchen unmittelbar dem eben getöteten Tier entnommen und sofort in die betreffende Fixierungsflüssigkeit übertragen werden. Spätestens müssen dieselben eine halbe Stunde nach der Tötung des Tieres oder nach der Entnahme aus dem lebenden Körper in die Fixierungsflüssigkeit kommen. Im anderen Falle läuft der Prozeß der Kernteilung ab, ohne daß es möglich ist, die Figuren der noch in der Teilung begriffen gewesenen Kerne zu Gesicht zu bekommen. Jedoch kann man manchmal auch an Objekten, die erst längere Zeit nach dem Tode in die Fixationsflüssigkeit übertragen sind, noch Kernteilungsfiguren beobachten; dieselben sind aber nicht so zahlreich und weniger deutlich wie an frischen Präparaten.

Damit hängt es dann weiterhin zusammen, daß man der betreffenden Fixierungsflüssigkeit die Möglichkeit geben muß, rasch das ganze Präparat vollständig zu durchdringen, und es ergibt sich daher als zweite Regel, daß die zu fixierenden Stückchen möglichst dünn genommen werden. Dieselben dürfen nicht dicker als 4 mm sein. Die Beobachtung dieser Regel ist um so notwendiger, als die meisten Fixierungsflüssigkeiten an und für sich die Eigenschaft besitzen, ziemlich langsam in die Organstückchen einzudringen.

Weiterhin folgt aus dem Gesagten, daß man nur in den allerseltensten Fällen in der Lage ist, an Organteilen von Leichen die Kernteilungsfiguren darzustellen, weil man fast nie so frühzeitig, wie es nötig wäre, sezieren kann. Es beschränkt sich vielmehr für menschliche Organe die Untersuchung meist auf Teile, die dem menschlichen Körper durch Operation entnommen sind.

Es gelingt zwar auch an Stückchen, die in Alkohol, Formalin oder Müller'scher Flüssigkeit gehärtet sind, wenn sie ganz frisch und in ganz dünnen Scheiben konserviert sind, die Kernteilungsfiguren darzustellen, doch eignet sich erfahrungsgemäß eine Reihe von anderen Gemischen besser dazu.

Die angewandte Fixierungsflüssigkeit muß das Volumen der zu fixierenden Stückchen sehr erheblich übersteigen. Sie muß gewechselt werden, wenn sie sich irgendwie trübt.

1) Von Fixierungsflüssigkeiten ist in erster Linie das Flemming-sche Chromosmiumsäuregemisch (S. 19) zu nennen. Färbung mit Safranin (S. 57).

Die Flemming'sche Methode mit nachfolgender Safraninfärbung hat den Vorteil, daß die ruhenden Kerne nur ganz blaß, die in der Teilung begriffenen Kerne dagegen sehr intensiv gefärbt werden. Dadurch ist es ermöglicht, schnell und schon bei schwacher Vergrößerung die in Teilung begriffenen Zellen mit annähernder Sicherheit zu erkennen und ein Urteil über ihre Lage und über ihre ungefähre Zahl zu gewinnen. Bei manchen anderen Färbemitteln wird keine wesentliche Differenz in der Intensität der Färbung zwischen ruhenden Kernen und dem Kerngerüst der in Teilung begriffenen Zellen erzielt.

Babes empfiehlt zur Färbung **Anilinwassersafranin.** Durch dasselbe wird die Färbung in kürzester Zeit bewirkt: 2 Teile Anilinöl werden mit 100 Teilen Wasser versetzt und Safraninpulver im Überschuß zugefügt. Erwärmen auf 60°. Filtrieren. Die Lösung hält sich zwei Monate lang. Will man aus irgend einem Grunde keine Safraninfärbung anwenden, so kann man auch mit wässeriger Gentianaviolettlösung (s. S. 57) färben. Besonders gut eignet sich auch Karbolfuchsin zur Färbung. Eine sehr brauchbare, von Hermann angegebene Modifikation des Flemming'schen Säuregemisches besteht darin, daß man die Chromsäurelösung durch 1-proz. Platinchloridlösung ersetzt. Dadurch treten die Spindel, der Zentral- und Polkörper besonders scharf hervor.

Beabsichtigt man die in der Flemming'schen Lösung fixierten Schnitte in Hämatoxylin zu färben, so kann man sich der Benda'schen Kupferhämatoxylinmethode (S. 53) bedienen.

**2) Sublimat.**

Die Konservierung in der gesättigten, wässerigen Sublimatlösung (s. S. 17) gestattet ebenfalls den Nachweis der Kernteilungsfiguren. Als Färbung empfiehlt sich die von Heidenhain-Biondi (s. S. 57), durch welche die ruhenden Kerne blauviolett, die in Teilung begriffenen grün gefärbt werden. Auch die Heidenhain'sche Eisenhämatoxylinfärbung (S. 52), sowie die Gram'sche Methode und ihre Modifikation von Weigert geben gute Resultate.

**3) ALTMANN's Fixierung.**

1) Einlegen 1 Stunde lang in 3-proz. Salpetersäure.
2) Gründliches Auswaschen.
3) Nachhärten in Alkohol.

**4) Alkohol.** Auch durch absoluten Alkohol allein kann man, wenn man ihn auf ganz dünne Stückchen einwirken läßt, eine Fixierung erreichen. Heißer Alkohol fixiert bedeutend schneller und leichter. Die Färbung kann dann nach der Vorschrift von BIZZOZERO-VASSALE bewirkt werden.

1) Färbung 10 Minuten lang in **EHRLICH'scher Gentianaviolettlösung:**

| | | |
|---|---|---|
| = | Gentianaviolett | 1,0 |
| | Alkohol | 15,0 |
| | Anilinöl | 3,0 |
| | Wasser | 80,0 |

2) Schnelles Auswaschen in absolutem Alkohol.
3) Übertragen in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 200, 2 Minuten lang.
4) 30 Sekunden in absolutem Alkohol.
5) 30—40 Sekunden in Chromsäure 0,1 : 100.
6) Alkohol absolut. 20—30 Sekunden.
7) Chromsäure 0,1 : 100, 30 Sekunden lang.
8) Alkohol absolut. 30 Sekunden lang.
9) Nelkenöl. Dasselbe wird so oft gewechselt, bis keine Farbe mehr abgeht.

Die Umständlichkeit und der kostspielige Verbrauch von Nelkenöl sind Nachteile dieser Methode.

**5) Chromsäurelösungen.**

Dieselben werden in einer Stärke von 0,3—1,0 Proz. angewandt. Die Dauer der Einwirkung beträgt im Durchschnitt 24 Stunden bis mehrere Tage. Die Chromsäure dringt sehr schwer ein, die Stückchen müssen daher ganz besonders klein sein.

**6) RABL'sche Chromameisensäure.**

Bereitung: Zu 200 ccm einer 0,3-proz. Chromsäurelösung werden 4—5 Tropfen konzentrierter Ameisensäure gebracht.

Dauer der Einwirkung 12—24 Stunden. Gründliches Auswaschen. Successive Härtung in 30-proz., 60-proz., 96-proz. Alkohol.

**7) FOL'sche Fixierungsflüssigkeit.**

| | | |
|---|---|---|
| 1-proz. Osmiumsäure | 2 | Raumteile |
| 1-proz. Chromsäure | 25 | „ |
| 2-proz. Essigsäure | 5 | „ |
| Wasser | 68 | „ |

**8) Chrompikrinsäure.**

| | | |
|---|---|---|
| Konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung | 10 | Raumteile |
| 1-proz. Chromsäure | 25 | „ |
| Wasser | 65 | „ |

**9) BAUMGARTEN's Methode.** Die Methode von BAUMGARTEN zur Darstellung der Kernteilungsfiguren verdient besondere Erwähnung, weil dieselbe kombiniert mit einer Färbung auf Bakterien angewandt werden kann.

1) Härtung mehrere Wochen lang in dünnen Chromsäurelösungen.
2) Färben 5—10 Minuten lang in konzentrierter alkoholischer Fuchsinlösung.
3) Kurzes Abspülen in Alkohol absolutus.
4) Färben 5—10 Minuten lang in wässeriger Methylenblaulösung.

Die Anwendung des Methylenblaus nach der vorherigen Färbung mit Fuchsin hat den Zweck, dies letztere aus der Zwischensubstanz zu verdrängen und so eine intensivere Färbung der Kerne resp. der Kernteilungsfiguren zu bewirken.

Will man gleichzeitig auf Bazillen, speziell auf Tuberkelbazillen untersuchen, so färbt man vorher 24 Stunden lang in Anilinwassermethylviolett und entfärbt mit verdünnter Säure, resp. schließt bei anderen Bakterien mit Hinweglassung der Säure direkt das Fuchsinmethylenblauverfahren an.

## B. Darstellung von Protoplasmastrukturen.

### I. Darstellung der Zellgranula nach ALTMANN.

1) Konservierung der dem eben getöteten Tiere entnommenen Organstückchen, 24 Stunden lang, in einer Mischung von
   5-proz. Lösung von doppelchromsaurem Kali
   2-proz. Lösung von Überosmiumsäure
   zu gleichen Teilen.
2) Mehrstündiges Auswaschen in fließendem Wasser.
3) Härtung in 75-proz., dann 90-proz., dann absolutem Alkohol.
4) Durchtränkung mit Xylol und Paraffineinbettung (cf. S. 30).
5) Schneiden (möglichst dünne Schnitte).
6) Entfernung des Paraffins aus den auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitten mit Xylol; dann Abspülen mit Alkohol.
7) Auftropfen einer 20-proz. Lösung von Säurefuchsin in kaltgesättigtem Anilinwasser und Erwärmen über der Flamme, bis die Lösung dampft.
8) Abkühlen lassen und Abspülen des Farbstoffes mit einer Mischung von konzentr. alkoholischer Pikrinlösung 1 Teil, Wasser 2 Teile.
9) Aufgießen einer zweiten Menge von Pikrinlösung und vorsichtiges Erwärmen derselben 30—60 Sekunden lang auf dem Paraffinofen.
10) Abspülen mit Alkohol, dann Xylol.
11) Xylol, Kanadabalsam.

### II. Modifikation von SCHRIDDE.

1) Fixierung der lebenswarmen Objekte in Formol-MÜLLER (1 : 9) 24 Stunden.
2) Gründliches Auswaschen in fließendem Wasser.
3) Einlegen in destilliertes Wasser 6 Stunden.

4) Einlegen in 1-proz. Osmiumsäurelösung auf 24 Stunden im Dunkeln.
5) Gründliches Auswaschen in fließendem Wasser.
6) Nachhärten in steigendem Alkohol (50—100-proz.) bei Lichtabschluß.
7) Einbetten in hartes Paraffin von 58° Schmelzpunkt mittels Chloroform bei Lichtabschluß.
8) Anfertigung sehr dünner Schnitte (1—2 $\mu$), Aufkleben mit der japanischen Methode auf den Objektträger. Entparaffinieren.
9) Aus 85-proz. Alkohol kommen die Objektträger aufrecht stehend für 2—24 Stunden in die Altmann'sche Anilinwassersäurefuchsinlösung (s. oben).
10) Differenzieren in einer Mischung von
konzentr. alkoh. Pikrinsäurelösung 1 Teil
20 Proz. Alkohol 7 Teile.

Man gießt von dieser Mischung etwas auf den Schnitt, wiegt den Objektträger hin und her und wiederholt die Differenzierung mit Pikrinalkohol, bis der Schnitt einen hellgelblichroten Farbenton angenommen hat.

11) Einschluß in Balsam.

Formalinpräparate muß man 12—24 Stunden in einer 5-proz. Lösung von Kaliumbichromat im Brutschrank beizen. Die Osmierung kann man auch erst an den Paraffinschnitten vornehmen.

III. **Russell** hat zur Darstellung von Zelleinschlüssen, speziell in Geschwülsten, folgendes Verfahren angegeben:

1) Härtung in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färbung, 10 Minuten lang oder länger, in einer gesättigten Lösung von Fuchsin in 2-proz. Karbolwasser.
3) Auswaschen in Wasser, einige Minuten lang.
4) Auswaschen in absolutem Alkohol, $^1/_2$ Minute lang.
5) Färben, 5 Minuten lang, in 1-proz. Lösung von Jodgrün, in 2-proz. Karbolwasser.
6) Schnelles Entwässern in absolutem Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam.

IV. **Arnold** empfiehlt zur Granulafärbung Paraffineinbettung und Färbung in Pianese's Dreifarbengemisch:

| | |
|---|---|
| Malachitgrün | 0,5 |
| Säurefuchsin | 0,1 |
| Martiusgelb | 0,01 |
| Dest. Wasser | 150,0 |
| Alkohol 96-proz. | 50,0 |

24 Stunden lang; dann flüchtiges Abspülen in Wasser und Differenzieren in Salzsäurealkohol (1 : 10,000), sehr feine Schnitte werden nach raschem Abspülen in Wasser mit Alkohol absolutus und langsamem Differenzieren in Origanumöl behandelt.

V. Zunächst zur Färbung der **Zentralkörper,** aber auch um manche protoplasmatische Strukturen deutlich zu machen, eignet sich vorzüglich die Eisenhämatoxylinfärbung von M. Heidenhain (S. 52).

Außer den Zentralkörpern bleiben fast immer die $\alpha$-Granulationen der Leukozyten und die elastischen Fasern schwarz gefärbt; ebenso die Nissl'schen Körner der Ganglienzellen.

In manchen Fällen, namentlich auch, wenn man auf die Eisenhämatoxylinmethode noch nicht eingeübt ist, empfiehlt es sich, mit Bordeaux nicht vor-, sondern nachzufärben. Zur Nachfärbung kann man auch wässerige Erythrosinfärbung anwenden.

**C. Darstellung der Zellgrenzen** wird an den Epithelien der serösen Häute und den Gefäßendothelien durch Silberimprägnation erreicht. Möglichst frische Membranen der serösen Häute werden ausgebreitet oder ausgespannt, gründlich mit destilliertem Wasser abgespült, um das Blut zu entfernen, und dann für einige Sekunden im Lichte in eine 0,1—0,25-proz. Lösung von Silbernitrat oder in eine Mischung von gleichen Teilen 1-proz. Silbernitrats und 2-proz. Osmiumsäure übertragen. Nach mehrmaligem Abspülen in destilliertem Wasser wird das Präparat in absolutem Alkohol fixiert.

Will man die Zellgrenzen an den Gefäßendothelien darstellen, muß man die Silberlösung oder Silberleim (durch Zusatz von 5 Proz. Gelatine) injizieren. Fixierung in absolutem Alkohol.

Renaut injiziert folgende Mischung: Wässerige Pikrinsäurelösung 4 Teile, 1-proz. Überosmiumsäure 1 Teil; hierzu wird vor dem jedesmaligen Gebrauch eine wechselnde Quantität 1-proz. Silbernitrats hinzugefügt (meist 1 Teil Silberlösung auf 4 Teile Osmiumpikrinsäurelösung).

## D. Bindegewebsfasern.

Die gröberen kollagenen Fasern sind schon mit Eosin und Ammoniakkarmin sichtbar. Weit deutlicher erscheinen sie auch in ihren feineren Fäserchen durch ihre leuchtend rote Farbe bei van Gieson-Färbung (S. 60). Noch distinkter erscheinen die feinsten Fasern mit folgenden Methoden:

**I. Mallory's Phosphormolybdänsäure-Hämatoxylin** ursprünglich für Achsenzylinderfärbungen angegeben. Modifikation von Ribbert.

1) Beliebige Fixierung. Gefrier-, Celloidin- oder Paraffinschnitte.
2) Übertragen der Schnitte mit Glasnadeln für 5—30 Sekunden in 10-proz. Phosphormolybdänsäure. Rasches Auswaschen in Wasser.
3) Färbung der Schnitte 20 Minuten bis 1 Stunde lang in einer einige Wochen lang dem Sonnenlichte ausgesetzten und vor dem Gebrauch filtrierten Lösung von

| | | |
|---|---|---|
| Phosphor-Molybdänsäure 10-proz. | 10 | Teile |
| Hämatoxylin | 1,75 | „ |
| Wasser | 200 | „ |
| Karbolsäure, kristallisiert | 5 | „ |

4) Auswaschen in 2—3mal gewechseltem 50-proz. Alkohol 5 bis 20 Minuten lang.
5) Entwässerung, Xylol, Balsam.

Kollagene Fasern, blau.

**II. MALLORY's Anilinblaumethode.**

1) Härten in Sublimat oder ZENKER'scher Lösung. Gefrier-, Celloidin- oder Paraffinschnitte.
2) Färben in 0,1-proz. wässeriger Säurefuchsinlösung 5—10 Minuten.
3) Auswaschen in Wasser.
4) Einlegen der Schnitte in eine 1-proz. Lösung von Phosphormolybdänsäure 2 Minuten.
5) Auswaschen in zweimal gewechseltem Wasser.
6) Färben in folgendem Gemisch, 20 Minuten lang:
   Anilinblau (wasserlöslich, GRÜBLER) 0,5 g,
   Orange G 2 g,
   Oxalsäure 2 g,
   Aqu. dest. 100 ccm
7) Auswaschen.
8) Entwässern in 95-proz. Alkohol, Trocknen mit Fließpapier, Aufhellen in Origanumöl, Xylol, Balsam.

Kollagene Fasern und Reticulum tiefblau, Kerne, Protoplasma, Achsenzylinder, Neuroglia, Fibrin rot, Blut, Markscheiden gelb.

Auch die MALLORY'sche Neurogliafärbung stellt Bindegewebsfibrillen gut dar.

**III. UNNA's Säurefuchsin-Pikrinmethode.**

1) Beliebige Härtung. Färbung 5—10 Minuten in

| | |
|---|---|
| Säurefuchsin | 0,25 |
| Pikrinsäure | 1,5 |
| Salpetersäure | 1,5 |
| Glyzerin | 10,0 |
| Aqu. dest ad | 100,0 |

Man löst das Säurefuchsin und die Pikrinsäure in der Mischung von Wasser und Glyzerin unter Kochen und setzt zuletzt die Salpetersäure hinzu.

2) Alkohol, Öl, Balsam.

Kollagen rot, Protoplasma, Muskeln und Elastin gelb oder orange.

**IV. UNNA's Polychrome Methylenblau — Neutrale Orceïnmethode.**

1) Fixierung in Alkohol.
2) Färbung in Polychromem Methylenblau (Grübler) 10 Minuten.
3) Gut abspülen in Wasser.
4) Schnitte auf dem Spatel mit Fließpapier etwas entwässern.
5) 1-proz. spirituöse Orceïnlösung ohne Säurezusatz 15 Minuten.
6) Alkohol absolutus, Bergamottöl (ev. beides zu wiederholen, falls der Schnitt noch zu blau ist).
7) Balsam.

Kollagen rot (basophiles Kollagen bläulich), Protoplasma bläulichbräunlich.

**V. UNNA's Safranin-Wasserblau-Tannin-Methode.**

1) Fixierung in Alkohol, Salpetersäure oder Pikrinsäure (nicht Formol!).
2) 1-proz. wässerige Safraninlösung 10 Minuten.
3) Gut abspülen in Wasser.
4) 10—15 Minuten in Mischung von 1-proz. Wasserblau in 33-proz. frisch bereiteter Tanninlösung.

5) Abspülen lange in destilliertem Wasser (in Leitungswasser kurz).
6) Alkohol absolutus, Öl, Balsam.
Kollagene Fasern blau, Kerne rot.

**VI. Unna's Wasserblau-Orceïnmethode.**

1) Beliebige Fixierung.
2) Färben mehrere bis 12 Stunden in

| | |
|---|---|
| Orceïn (Grübler) | 1,0 |
| Wasserblau | 0,25 |
| Alkohol absol. | 60,0 |
| Glyzerin | 10,0 |
| Wasser ad | 100,0. |

3) Entwässerung in einfachem oder saurem Alkohol, Öl, Balsam.
Kollagen blau, Elastin rot, Protoplasma und Muskeln in Mischfarben.

VII. Nach **Maresch** ergibt die Achsenzylindermethode von Bielschowsky eine ausgezeichnete Darstellung der feinsten Bindegewebsfibrillen, z. B. der Gitterfasern der Leber.

1) Fixierung in Formol. Auswässern. Gefrierschnitte aus destilliertem Wasser auf 12—24 Stunden in eine 1-proz. Lösung von Silbernitrat.
2) 2—30 Minuten, je nach Dicke der Schnitte in jedesmal frisch zu bereitende Lösung; zu 5 ccm einer 10-proz. Argentum nitricum-Lösung setzt man 5 Tropfen einer möglichst reinen 40-proz. Natronlauge. Der Niederschlag wird durch tropfenweises Zusetzen von Ammoniak gerade gelöst, die Flüssigkeit dann auf 20 ccm aufgefüllt.
3) Abspülen in destilliertem Wasser.
4) Reduktion in 20-proz. Formol, bis die Schnitte schiefergrau oder graubraun aussehen.
5) Übertragen auf etwa 10 Minuten in ein saures Goldbad (10 ccm Aqu. dest. mit 2—3 Tropfen Goldchlorid und ebensoviel Eisessig).
6) 5 Proz. Fixiernatron (zur Entfernung etwa nicht reduzierten Silbers) $^1/_2$ Minute.
7) Einschluß in Glyzerin oder Alkohol-Karbolxylol (beide nur kurz einwirken lassen) Balsam.

Auch Alkoholfixierung, sowie Celloidin- und Paraffineinbettung sind anwendbar. Das Celloidin wird am besten vor der Imprägnation durch Alkohol-Äther gelöst, während man die Paraffinschnitte zweckmäßig erst nach der Vergoldung aufklebt und von Paraffin befreit.

## E. Elastische Fasern.

Die im frischen Präparat durch ihre starke Lichtbrechung und ihre Resistenz gegen Säuren und Alkalien auffallenden elastischen Fasern werden im gehärteten Schnittpräparat hauptsächlich durch die Weigert'sche und die Taenzer-Unna'sche Methode dargestellt. Beide haben eine Reihe mehr oder weniger brauchbarer Modifikationen durchgemacht; beide lassen sich mit einer Anzahl anderer Färbungen kombinieren.

**I. Taenzer-Unna's Orceïnmethode.** Man hält sich folgende Lösungen vorrätig:

1) Orceïn (Grübler) 0,1, Alkohol (95-proz.) 20,0, Aqu. dest. 5,0.
2) Acid. muriat. 0,1, Alkohol 20,0, Aqu. dest. 5,0.

Vor dem Gebrauch werden beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt.

1) Härtung am besten in Alkohol, Formalin oder Sublimat, doch auch Müller'sche Flüssigkeit anwendbar. Gefrier-, Paraffin- oder Celloidinschnitte.
2) Färben 12—24 Stunden in obiger Orceïnlösung oder 15 bis 30 Minuten in 1-proz. Orceïn in 1-proz. Salzsäurealkohol.
3) Differenzieren in Alkohol oder Salzsäurealkohol.
4) Entwässern, Öl, Balsam.

Elastische Substanz braunrot, Hornsubstanz braunrot, alles übrige schwach tingiert. Man kann die Kerne mit Borax oder Lithionkarmin vor-, oder mit polychromem Methylenblau oder Thionin nachfärben. Das Protoplasma läßt sich gelb färben, wenn man dem Alkohol etwas Pikrinsäure zusetzt.

Pranter färbt in 8—24 Stunden in

| | |
|---|---|
| Orceïn D (Grübler) | 0,1 |
| Salpetersäure | 2,0 |
| Alkohol (70-proz.) | 100,0. |

wäscht in Wasser aus und entwässert in Alkohol.

Wenn das Celloidin in den Orceïnpräparaten zu dunkel bleibt, so überträgt man die Schnitte aus dem Salzsäurespiritus in ein Schälchen mit Wasser, dem mäßig viel Liquor Ammonii caustici zugesetzt ist; hier werden die Schnitte blau und geben Farbstoff ab; dann bringt man sie in den Salzsäurespiritus zurück.

Schlecht färbende Orceïnlösungen kann man nach E. Wolff wieder farbkräftig machen, indem man sie in offener Flasche dem Lichte aussetzt.

Nach Triepel kann man auch kleine, nicht mehr als 2 mm dicke Stücke in Orceïn durchfärben. Man löst dann 0,5 Orceïn in 70 ccm 70-proz. Alkohol, dem 20 Tropfen Salzsäure zugesetzt sind.

Fast alle sonstigen Gewebsbestandteile kann man daneben in höchst eleganter Weise darstellen durch die **Vierfachfärbung nach E. Fraenkel.**

1) Vorfärben in Lithionkarmin; Differenzieren in Salzsäure-Spiritus; kurz, weil die nunmehr vorzunehmende
2) Saure Orceïnlösung die weitere Differenzierung bewirkt.

| | |
|---|---|
| Orceïn (Grübler) | 0,5 |
| Alkohol absol. | 40,0 |
| Acid. nitric. gutt. | 40 |
| Aqu. dest. | 20,0. |

Von dieser Stammlösung etwas abgießen und mit 3-proz. Salpetersäure-Spiritus so lange verdünnen, bis die gewünschte Farbennuance, in der man die elastischen Fasern gefärbt haben will, entsteht. Man färbt am besten 12—24 Stunden.

3) Differenzieren in 80-proz. Spiritus; bei Überfärbung in Salpetersäure-Spiritus (nicht zu lange), dann 80-proz. Spiritus.

4) Nachfärbung in

| | |
|---|---|
| Indigokarmin | 0,5 |
| Konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung | 200,0. |

Man färbt 5—10 Minuten; dann kurzes Durchziehen durch

| | |
|---|---|
| Eisessig | 3,5 |
| Aqu. dest. | 100,0. |

Abspülen in Wasser, 96-proz. Alkohol, Bergamottöl, Balsam.
Kerne rot; Elastin braunschwarz, Kollagen grün, Muskulatur gelb.

### II. Weigert's Elastinmethode.

1) Härtung am besten in Alkohol oder Sublimat, aber auch in Formol, Müller'scher Flüssigkeit, Flemming'scher Lösung usw.
2) Gefrier- oder Paraffinschnitte; Celloidin ist weniger zu empfehlen, da die Schnitte lange mit absolutem Alkohol behandelt werden.
3) Färben 20 Minuten bis 1 Stunde lang in einer auf folgende Weise bereiteten Farbe: 200 ccm einer wässerigen Lösung von 1-proz. Fuchsin und 2-proz. Resorcin werden in einer Porzellanschale zum deutlichen Kochen gebracht. Dann Zusatz von 25 ccm Liquor ferri sesquichlorat. und unter Umrühren noch 3—5 Minuten kochen lassen, wobei sich ein schlammiger Niederschlag bildet. Abkühlen lassen und Filtrieren. Die filtrierte Flüssigkeit wird weggegossen, der auf dem Filter zurückbleibende Niederschlag aber mit diesem getrocknet und in die zum Kochen benutzte Porzellanschale zurückverbracht, in der sich gewöhnlich ebenfalls noch Niederschlag befindet. Unter stetem Umrühren wird der Niederschlag mit 200 ccm 94-proz. Spiritus gekocht, dann läßt man erkalten und füllt das Filtrat mit Alkohol wieder auf 200 ccm auf. Schließlich werden 4 ccm HCl zugesetzt. (Fertig zu beziehen von Grübler in Leipzig.)
4) Abwaschen in Alkohol, Aufhellen in Xylol (nicht Öl), Kanadabalsam.
5) Eventuell Vor- oder Nachfärben mit kernfärbenden Karminlösungen (s. S. 53ff.).

Die Lösung hält sich monatelang. Ist der Untergrund nicht hell genug, so kann man eine Differenzierung in Salzsäurealkohol vornehmen.

Bei dieser Methode treten die feinsten Fäserchen so zahlreich und deutlich hervor, wie bei keiner anderen.

Um mit Sicherheit eine ganz isolierte Färbung der elastischen Fasern zu erreichen, muß man nach Fischer stundenlang in absolutem Alkohol differenzieren. Setzt man letzterem etwas Pikrinsäure zu, so erhält man eine kontrastreiche Protoplasmafärbung. Durch Anschließen der van Gieson-Methode an die Elasticafärbung erzielt man sehr universelle Färbungen.

Hart empfiehlt die Elasticafärbung gleichzeitig mit langer Differenzierung der Lithionkarminvorfärbung vorzunehmen, indem er die Schnitte über Nacht in Salzsäurealkohol beläßt, dem 4—6 Proz. der Weigert-schen Fuchselinlösung zugesetzt sind. Auswaschen in 90-proz. Alkohol, dann Alkohol absolutus, Xylol, Balsam.

Das Fuchsin obiger Farblösung kann auch durch andere Anilinfarben ersetzt werden. Nach Fischer's Vorschlag kennzeichnet man

diese Lösungen kurz durch Einfügen der Silbe „el“ in den Farbstoff, also Fuchselin, Vesuvelin, Safranelin, Thionelin usw. Das Safranelin ergibt gute Rotfärbung der elastischen Fasern, die dann zu einer Hämatoxylinkernfärbung deutlich kontrastieren.

Der Weigert'schen Fuchselinfärbung kann man auch die Weigert'sche oder Gram'sche Bakterienfärbung nachfolgen lassen. Ebenso kann man Fuchselin- oder Safranelinfärbung mit der Fibrinmethode kombinieren.

Gleichzeitige Elastin- und Tuberkelbazillenfärbung läßt sich erreichen durch 24stündige Karbolfuchsinfärbung (oder 1 Stunde bei 37°) und nachfolgende Fuchselinfärbung, die auch die Differenzierung genügend besorgt. Will man gleichzeitig Kernfärbung haben, so kann man mit Hämatoxylin vor- oder nachfärben, bevorzugt dann aber der Farbenkontraste wegen besser einen braunen Elastinfarbstoff (Vesuvelin).

1) Karbolfuchsin 24 Stunden,
2) Abspülen in 70-proz. Alkohol,
3) Vesuvelinfärbung 1 Stunde,
4) Abspülen in Wasser,
5) Alkohol absolutus 1 Stunde,
6) Abspülen in Wasser,
7) Hämatoxylinfärbung,
8) Abspülen in Wasser,
9) Alkohol — Xylol — Balsam.

Über gleichzeitige Färbung von elastischen Fasern und Bakterien s. auch Kap. XI Polychrome Methylenblaumethode von Zieler.

Zur gleichzeitigen Fett- und Elastinfärbung empfiehlt B. Fischer folgendes Verfahren für Gefrierschnitte:

1) 1 Stunde in Fuchselinscharlach (vor dem Gebrauch filtrieren!) Schale zudecken.
   74 ccm Fuchselin werden mit 26 ccm Aqua dest. gekocht und zu der kochenden Lösung Scharlach oder Sudan III im Überschuß zugegeben. Erst nach dem Abkühlen verwendbar.
2) 15 Minuten in Scharlach R. (gelöst in kochendem 70-proz. Alkohol); nach dem Abkühlen filtrieren! Schale zudecken.
3) Abspülen in Wasser.
4) Glyzerin.

## F. Verhornung.

Verhornte Partien färben sich im allgemeinen mit sauren Farben (Eosin). Bei der van Gieson-Methode werden sie deutlich gelb. Bei der Gram'schen und Weigert'schen Bakterienfärbung behält verhorntes Gewebe die blaue Farbe bei, die auch gegen lange Entfärbung in saurem Alkohol resistent ist; dadurch kann Horn von anderen Substanzen unterschieden werden.

Mehrfach ist auch zur Darstellung verhornter Partien mit Vorteil die Heidenhain'sche Hämatoxylin-Eisenlackmethode (s. S. 52) mit zwei Stunden langem Färben in Hämatoxylin angewandt worden.

Sehr schöne Färbung der verhornten Partien erhält man auch durch folgende Methode von Ebbinghaus:

1) Färben gefrorener oder eingebetteter Schnitte in konzentr. wässeriger Goldorangelösung 15 Minuten oder länger.
2) Auswaschen in destilliertem Wasser.

3) Differenzieren in salzsaurem (1-proz.) Alkohol (70-proz.) eine Minute.
4) Auswaschen in destilliertem Wasser.
5) Neutralisieren in Ammoniakwasser, bis gelbe Wolken abgehen.
6) Auswaschen in destilliertem Wasser, bis der Schnitt seine diffuse Gelbfärbung eben verloren hat.
7) Gegenfärbung in Hämatoxylin (eventuell nochmals differenzieren).
8) Auswaschen in destilliertem Wasser.
9) Alkohol, 96-proz., nicht zu lange.
10) Origanumöl — Balsam.

Die bei dem Verhornungsprozeß auftretenden Keratohyalinkörnchen sind in starken Mineralsäuren löslich, in verdünnten Alkalien quellbar. Sie lassen sich mit Hämatoxylin, sowie nach der Gram-schen Methode darstellen. Ein Verfahren von Herxheimer besteht in der Färbung der in Alkohol und Äther von Celloidin befreiten Schnitte $^1/_2$ Stunde lang auf dem Objektträger in Anilinwassermethylviolett; dann Abtrocknen und $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lange Entfärbung mit immer wieder abgetupftem und frisch zugesetztem Menthol-Vasogen (von Pierson, Hamburg), bis ein hellblauer Ton zurückbleibt.

Darstellung des **Keratohyalins** nach Unna:

Man überfärbt die Schnitte mit Hämatoxylin und legt sie dann 10 Sekunden lang in eine 0,5-proz. Lösung von Kaliumhypermanganat und entfärbt und entwässert in Alkohol; oder man bringt die in Hämatein überfärbten Schnitte für 10 Minuten in 33-proz. Lösung von Eisenvitriol und entfärbt in Alkohol; oder man taucht die überfärbten Schnitte für kurze Zeit in 10-proz. Lösung von Eisenvitriol und entfärbt in Alkohol; oder man taucht die überfärbten Schnitte für kurze Zeit in 10-proz. Lösung von Eisenchlorid.

**Eleïdin** ist durch Hämatoxylin nicht färbbar, schwärzt sich mit Osmiumsäure. Es läßt sich nach Buzzi darstellen durch Färben einige Minuten in dünner Kongorotlösung (2—3 Tropfen einer 1-proz. Lösung auf ein Uhrschälchen mit Wasser) und Abspülen mit Wasser. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Eleidin rot. Keratohyalin dunkelblau. Auch durch 1—2 Min. langes Färben in einem Schälchen mit Wasser, dem 5—6 Tropfen einer 1-proz. wässerigen Nigrosinlösung zugesetzt sind, ist es darstellbar. Nach Dreysel und Oppler färbt sich Eleïdin nach folgender Methode:

1) Härtung 2—3 Tage in absolutem Alkohol. Celloidineinbettung. Trocken schneiden.
2) Färben $^1/_2$—6 Minuten in Karmin, Liquor Ammon. caust., Pikrinsäure āā 1,0, Aqu. dest. 200,0. Vor Verwendung des Farbstoffs läßt man das Ammoniak im Wasserbad oder in einer offenen Schale abdampfen. Sorgfältig filtrieren.
3) $^1/_2$-Proz. pikrinsauren Alkohol — Alkohol absolutus — Öl — Balsam. — Oder Abspülen in Wasser, Färben in verdünnter Hämatoxylinlösung, Auswaschen in Wasser, Alkohol, Öl, Balsam. Eleïdin rot, in letzterem Fall Keratohyalin blau gegengefärbt.

## G. Fibrin.

Zur Untersuchung des Fibrins genügt sehr oft eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin an möglichst dünnen Schnitten. Auf diese Weise gelingt es z. B. ganz gut, das Fibrinnetz bei der fibrinösen Pneumonie und innerhalb der diphtherisch entzündeten Schleimhäute sichtbar zu machen. Besonders bewährt hat sich für den Fibrinnachweis auf und in Schleimhäuten und serösen Häuten in neuester Zeit die van Gieson'sche Färbung.

Eine vorzügliche Methode zur Untersuchung und Färbung des Fibrins ist die von Weigert angegebene, die sich von der Bakterienfärbung desselben Autors (s. S. 110) nur in der Wahl der Entfärbungsflüssigkeit unterscheidet. Auch mit Mallory's Anilinblaumethode (s. S. 68) färbt sich das Fibrin meist distinkt.

Weigert'sche Fibrinfärbungsmethode.

1) Alkoholhärtung.
2) Färbung 5—15 Minuten lang in konzentrierter Anilinwassergentianaviolettlösung oder Methylviolettlösung.

Herstellung der Farblösung: 10 ccm Anilinöl werden mit 100 ccm Wasser mehrere Minuten gründlich durchgeschüttelt; dann läßt man das nicht gelöste Anilin absetzen und filtriert durch ein gut mit Wasser angefeuchtetes (!) Filter. Das Filtrat darf keine Anilintropfen enthalten. Zu 90 ccm desselben setzt man 11 ccm konzentrierter alkoholischer Gentianaviolettlösung. Die Mischung, die sich nicht lange hält, ist vor dem Gebrauch stets zu filtrieren.

3) Abspülen in 0,6-proz. NaCl-Lösung.
4) Abtrocknen auf dem Spatel oder Objektträger mit Fließpapier.
5) 2—3 Minuten auf dem Objektträger oder Spatel in Jodjodkalilösung (1 : 2 : 300) oder 5-proz. mit Jod gesättigte Jodkalilösung.
6) Abtrocknen mit Fließpapier.
7) Entfärben in

Anilinöl 2 Teile
Xylol 1 Teil

oder schonender zu gleichen Teilen.
8) Entfernen des Anilin-Xylols durch Xylol.
9) Kanadabalsam.

Auf diese Weise wird das Fibrin schön blau gefärbt, während alles andere, ausgenommen Bakterien, entfärbt wird. Nicht gefärbt werden namentlich auch Blutkörperchenreste, käsige Massen und Koagulationsnekrosen.

Kromayer empfiehlt statt der Entfärbung (sub 7) in Anilinöl eine solche in Azetonxylol 1 : 5—5,5. So sollen Mikroorganismen, Fibrin, collagenes Gewebe, Epithelfasern usw. zu gleicher Zeit gefärbt werden.

Zenker empfiehlt die Anilinwassergentianaviolettlösung nicht durch Zugießen alkoholischer Farblösung, sondern durch direktes Auflösen der Farbe in Anilinwasser herzustellen, weil dann die Farbe weniger leicht ausgezogen werden soll. Auch verlängert er die Entfärbungszeit dadurch, daß er 1 Teil Anilinöl mit 2 Teilen Xylol mischt.

Nach Weigert genügt für die Fibrinfärbung auch einfache Lösung von Methylviolett in 70—80 Proz. Alkohol. Man kann auch folgende

haltbare Stammlösungen vorrätig haben: 1) Alkohol absol. 33 ccm, Anilinöl 9 ccm, Methylviolett im Überschuß, 2) Gesättigte wässerige Methylviolettlösung. Zur Färbung werden 3 ccm von Lösung 1 mit 27 ccm Lösung 2 gemischt.

Eine schöne Doppelfärbung läßt sich erzielen, wenn man die Präparate mit Lithionkarmin (s. S. 54) vorfärbt. Die Fibrinfärbung gelingt an Alkohol-, Sublimat- und Formalinpräparaten. An Schnitten von Chrompräparaten gelingt sie ebenfalls, wenn man sie erst für etwa 10 Minuten in $^1/_3$-proz. Lösung von übermangansaurem Kali und nach mehrfachem Wässern in eine 5-proz. Oxalsäurelösung für einige Stunden einlegt.

### Modifikation der Fibrinfärbung nach Beneke.

Wenn man die entfärbende Fähigkeit des Anilinölxylols durch stärkeren Zusatz von Xylol herabsetzt, so kann man auch eine Reihe anderer Gebilde mit der Fibrinfärbungsmethode von Weigert darstellen. Beneke empfiehlt zu diesem Zweck 2 Teile Anilinöl mit 3 Teilen Xylol zu mischen. Man kann auf diese Weise darstellen: 1) Kernteilungsfiguren, 2) Bindegewebsfasern, blauviolett bis rötlichviolett, 3) elastisches Gewebe, leuchtend rot, und dadurch von den dunkelblauen Bindegewebsfibrillen scharf abgehoben, 4) Fibrillen des Knochengewebes und Sharpey'sche Fasern, 5) quergestreifte Muskulatur mit deutlicher Abhebung der dunkelblauen Querscheiben, 6) Neuroglia. Außer dieser färben sich im Zentralnervensystem nur noch die Kerne der Ganglienzellen, 7) die Epithelfibrillen des Plattenepithels.

Der Grad der nötigen Entfärbung ist für die einzelnen aufgezählten Gewebe ein verschiedener und muß eventuell dadurch kontrolliert werden, daß man den Schnitt probeweise in reines Xylol bringt und unter dem Mikroskop untersucht.

### Fibrinfärbung von Kockel.

Dieselbe ist dem Weigert'schen Verfahren der Markscheidenfärbung nachgebildet und läßt sich an beliebig gehärtetem Material ausführen. Die Stücke werden in Paraffin eingebettet, auf den Objektträger aufgeklebt, vom Paraffin befreit und für 5—10 Minuten in 1-proz. bis höchstens 5-proz. Chromsäurelösung übertragen. Dann werden die Schnitte kurz ausgewässert, 5 bis 20 Sekunden lang, bis sie blaß aber noch deutlich gelb sind. Dann Färben in Weigert'schem Hämatoxylin (Hämatoxylin 1 g, Alkoh. absol. 10,0 ccm, Aqu. dest. 90,0. Nach Lösung füge hinzu konzentr. wässerige Lithionkarbonatlösung 1 ccm), 15—20 Minuten lang. — Abspülen in Wasser. — Übertragen für 1 Minute in konzentrierte, etwa 10-proz. wässerige Alaunlösung, bis die Schnitte dunkelblau sind. — Auswaschen in Wasser. — Vorsichtige Differenzierung 3—6 Minuten lang in Weigert'scher Borax-Ferricyankalilösung, die mit der 3-fachen Menge Wasser verdünnt ist. — Auswaschen in Wasser. — Übertragen 15 Minuten bis 1 Stunde lang in konzentrierte wässerige Alaunlösung. — Auswaschen in Wasser. — Gegenfärbung in Karmin oder stark verdünntem Safranin. — Entwässern in Alkohol, Öl, Balsam.

An Rückenmarkstücken mit Meningitis, die in Formalin gehärtet und in Celloidin eingebettet waren, kann man nach von Kahlden das Fibrin oft auch direkt nach der Weigert'schen Markscheidenfärbung darstellen, nachdem die Schnitte nach Gudden 10 Stunden in 0,55-proz. Chromsäure verweilt haben.

### Fibrinfärbung nach Schueninoff.

1) Fixierung und Einbettung beliebig.
2) Schnitte für 12—24 Stunden in 3-proz. Wasserstoffsuperoxyd.

3) Direkt für 12—20 Minuten in

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin | 1,75 |
| Wasser | 200,0 |
| Acid. carbol. cryst. | 5,0 |

10-proz. wässerige Lösung von Phosphorwolframsäure 10 ccm.
Die Farbe muß 4—8 Wochen in der Sonne reifen, ist vollkommen durchsichtig und wird nicht filtriert.
4) Abspülen in Wasser.
5) Differenzieren in 5—10-proz. Lösung von Phosphorwolframsäure (Glasnadeln!) 20 Minuten bis 24 Stunden.
6) Wasser, 95-proz. Alkohol, absol. Alkohol, Xylol, Balsam.
Fibrin tiefblau, Kerne dunkelviolett, Plasma blaßviolett.

## H. Schleim.

Schleimig entartete Gewebe werden am besten frisch untersucht. Schon durch verdünnte Essigsäure wird intensive Trübung bewirkt (fehlt bei Pseudomuzin), die in konzentrierten Lösungen nicht verschwindet. In alkalischen Flüssigkeiten löst sich der Schleim. Die Härtung erfolgt am besten in MÜLLER'scher Flüssigkeit oder Formalin.

Zum Nachweis des Muzins empfiehlt HOYER Härtung resp. Fixierung in Sublimat ohne nachherige Jodbehandlung und Paraffineinbettung; doch läßt sich die Färbung auch an Celloidinpräparaten erzielen.

Das Muzin färbt sich gut mit allen basischen Anilinfarben, ganz besonders mit Methylenblau (in wässeriger Lösung).

Die Metachromasie, die der Schleim mit gewissen Anilinfarben gibt, wird ebenfalls häufig zur Darstellung benutzt. Mit Thionin und Toluidinblau (2 Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung auf 5 ccm Wasser) erhält man eine Doppelfärbung, indem das Muzin blaurot bis rotviolett, die übrigen Bestandteile des Gewebes aber blau werden. Man kann in Kanadabalsam einschließen; meist ist aber die Metachromasie viel deutlicher bei Untersuchung in Wasser oder ganz dünner Thioninlösung. Auch mit polychromem Methylenblau wird schöne Metachromasie erzielt.

Amyloid, Knorpelgrundsubstanz, Mastzellengranula und Gehirnsand zeigen ähnliche Färbung.

Elektive Schleimfärbungen sind die folgenden:

**P. MAYER's Muzihämateïnfärbung.**

Hämateïn 0,2 g mit einigen Tropfen Glyzerin verrieben.

| | |
|---|---|
| Chloraluminium | 0,1 g |
| Glyzerin | 40 ccm |
| Wasser | 60 ccm. |

Färbung 10 Minuten. Auswaschen in Wasser. Neigt der Schleim stark zur Quellung, so nimmt man besser folgende alkoholische Lösung:

| | |
|---|---|
| Hämateïn | 0,2 g |
| Chloraluminium | 0,1 g |
| 70-proz. Alkohol | 100 ccm |
| Salpetersäure | 1—2 Tropfen. |

Die Kerne können mit Karmin rot vorgefärbt werden. Schleim blau.

**P. MAYER's Muzikarminfärbung.**

Karmin 1,0, Chloraluminium 0,5 und destilliertes Wasser 2,0 werden über einer kleinen Flamme etwa 2 Minuten lang erhitzt, bis

das Gemisch ganz dunkel geworden ist, dann setzt man nach und nach 100 ccm Alkohol von 50 Proz. hinzu und filtriert 24 Stunden später. Diese Stammlösung ist haltbar und wird zum Gebrauch mit Wasser auf $^1/_{10}$ verdünnt. Färbt die Lösung auch die Kerne, so ist sie zu sauer; dann muß man zur Verdünnung gewöhnliches Wasser nehmen oder eine Spur Natriumkarbonat zusetzen. Färbung 10 Minuten, Wasser, Einschluß in Balsam, eventuell Vorfärbung der Kerne mit Hämalaun.

Eine gute Färbung des Muzins und der sternförmigen Zellen des Schleimgewebes erhält man auch mit der VAN GIESON'schen Methode. Auch Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin geben oft gute Resultate.

## I. Colloid (epitheliales Hyalin).

Gewebe mit teilweise kolloider Entartung können in Alkohol, Formalin oder MÜLLER'scher Flüssigkeit gehärtet werden. Zur Färbung eignet sich sowohl Hämatoxylin wie namentlich Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Durch die VAN GIESON'sche Färbung (s. S. 60) wird das Colloid gelbrot, oft auch leuchtend rot gefärbt, so daß es in Schnitten sich auf das deutlichste von den übrigen Gewebsbestandteilen abhebt.

Die Farbenreaktion allein genügt aber nicht zur Unterscheidung von Hyalin, da Colloid manchmal ebenso leuchtend rot gefärbt wird wie Hyalin.

## K. Hyalin.

Zur Untersuchung der bindegewebigen Hyalinsubstanzen bedient man sich der Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Aber auch bei einfach gefärbten Schnitten tritt schon die homogene, glasige Beschaffenheit des hyalin entarteten Bindegewebes meist hinreichend deutlich hervor.

Vorzüglich eignet sich zum Nachweis des Hyalins die VAN GIESON-sche Methode (s. S. 60), welche demselben eine leuchtend rote Farbe verleiht. Auch mit der RUSSEL'schen Methode erzielt man leuchtend rote Hyalinfärbung.

Oft ist es nötig, den Nachweis fehlender Amyloidreaktion zu führen, da beide Substanzen oft morphologisch sehr ähnlich auftreten.

## L. Amyloid.

Amyloid ist eine Verbindung von Eiweißkörpern mit Chondroitinschwefelsäure, an die ein Teil der spezifischen Amyloidreaktionen gebunden ist.

Amyloid entartete Gewebe können an frischen Schnitten, die sich wegen der festen Konsistenz leicht anfertigen lassen, oder nach vorhergegangener Härtung in Alkohol, Formalin oder MÜLLER'scher Flüssigkeit untersucht werden.

Zur Erkennung der amyloiden Degeneration dienen die Jodreaktionen und die Metachromasie mit Anilinfarben.

### a) Jodreaktion.

Man bringt die Schnitte in eine kognakbraune Jodlösung, die man sich durch Verdünnen der gewöhnlichen Lugol'schen Lösung (s. S. 11) mit destilliertem Wasser herstellt. Nach 3 Minuten wäscht man in Wasser aus und untersucht in Glyzerin. Die amyloid degenerierten Partien erscheinen dann braunrot, während das übrige Gewebe eine hellgelbe Farbe angenommen hat.

Die braunrote Farbe wird noch glänzender, wenn man zu der Jodlösung 25-proz. Glyzerin zusetzt. Die Farbenreaktion ist vergänglich. Schnitte aber können als Dauerpräparate wenigstens etwas länger aufgehoben werden, wenn man das von Langhans für Glykogenpräparate empfohlene Verfahren (s. S. 86) anwendet.

### b) Jodschwefelsäurereaktion.

Legt man einen in der eben angegebenen Weise mit Jod behandelten Schnitt in 1-proz. Schwefelsäure, so wird die braune Farbe der amyloid degenerierten Teile entweder eine gesättigtere, oder sie geht in eine violette, blaue bis grüne Färbung über. Manchmal treten einzelne dieser Farbennuancen schon bei bloßer Jodbehandlung auf. Am besten verfährt man so, daß man eine sehr stark verdünnte, rheinweinfarbene Jodjodkalilösung nimmt, und die Schnitte nur so lange behandelt, bis sich das Amyloid zu bräunen anfängt. Dann bringt man die Schnitte auf den Objektträger und läßt vom Rande des Deckglases etwas konzentrierte Schwefelsäure zufließen. Reaktionen mit Jod, die der Amyloidreaktion ähnlich sind, geben

1) Die Corpora amylacea (versicolorata), die sich hauptsächlich in der Prostata und im Zentralnervensystem finden. Sie färben sich mit Jodjodkalilösung braun, während das übrige Gewebe gelb bleibt. Oft nehmen sie auch eine bläuliche bis grünliche Farbe an und werden bei Schwefelsäurezusatz rötlich. Nach Siegert kann man sie gut darstellen, indem man die Schnitte in starker Jodjodkalilösung tiefbraun färbt und in absolutem Alkohol wieder vollkommen entfärbt. Dann kommen sie in 10-proz. Salzsäurelösung, werden in Wasser wieder entsäuert und in jodhaltigem Alkohol (1 Teil Jodtinktur auf 4 Teile absoluten Alkohol) entwässert und in Origanumöl eingeschlossen. Auch die Langhans'sche Glykogenmethode gibt gute Resultate. Die Amyloidreaktionen mit Methyl- oder Gentianaviolett sind ebenfalls meist positiv. Morphologisch ähnliche Körperchen ohne Jodreaktion werden corpora flava genannt.
2) Amylumkörner färben sich mit sehr verdünnter Lugolscher Jodlösung (1 : 4—5) blau.
3) Cellulose in Pflanzenteilen färbt sich in einfacher Jodlösung gelb. Läßt man nun aber nach kurzem Abspülen in Wasser vom Rande des Deckgläschens her reine Schwefelsäure zufließen, so färbt sich Cellulose da, wo die Schwefelsäure frisch zur Einwirkung kommt, kornblumenblau.

c) Gentianaviolett und Methylviolettreaktion.

1) Färben in einer 1-proz. Farbstofflösung, 3—5 Minuten.
2) Auswaschen in destilliertem Wasser, dem 1-proz. Salzsäure zugesetzt ist oder in 1—2-proz. Essigsäure.
3) Gründliches Auswaschen in destilliertem Wasser.
4) Untersuchung in Kali aceticum oder Lävulose.

Die Amyloidsubstanz ist purpurrot, das übrige Gewebe blau gefärbt. Die Färbung hält sich eine Zeit lang, so daß man die Schnitte nach Umrandung mit Wachs und Überziehen mit Lack oder nach Einschluß in Glyzeringelatine auch als Dauerpräparate aufheben kann. In Glyzerin wird die Färbung allmählich ausgezogen.

Außer dem Amyloid zeigen die gleiche Metachromasie a) Schleim, b) manche colloide Massen, c) die Mastzellengranula, d) junges Knorpel- und Knochengewebe. Vor Verwechslung schützt das morphologische Verhalten und die Jodreaktion.

Celloidinschnitte ergeben meist undeutliche Reaktion; man benutzt besser Gefrier- oder Paraffinschnitte. Einlegen in Kanadabalsam ist auf die gewöhnliche Art nicht möglich, da Alkohol die Färbung auswäscht. Nach Meyer kann man für Kurszwecke so verfahren, daß man Paraffinschnitte aufklebt, von Paraffin befreit und auf die oben angegebene Art färbt. Dann wird das Präparat an der Luft getrocknet und sofort mit Xylol und Balsam behandelt. Allerdings leiden dabei die feineren Gewebsstrukturen, während die Farbenunterschiede erhalten bleiben.

d) Methylgrün.

Wendet man Methylgrün in derselben Weise an wie Methylviolett sub c, so färben sich die amyloiden Partien violett, das übrige Gewebe, namentlich die Kerne grün.

e) Jodgrün.

1) 24 Stunden langes Färben frischer oder gehärteter Schnitte in einer Lösung von Jodgrün 0,5
Aqu. dest. 150.
2) Einfaches Auswaschen in Wasser.

Die amyloiden Massen werden rotviolett, die übrigen Gewebe bleiben grün. Stilling rühmt dieser Reaktion gegenüber dem Methylviolett eine größere Sicherheit nach.

f) Thioninfärbung von Kantorowicz.

Färben 5 Minuten lang in konz. wässeriger Thioninlösung, Auswaschen in destilliertem Wasser, Übertragung auf den Objektträger, Abtrocknen mit Fließpapier, Entwässern und Aufhellen in Anilinöl-Xylol, Xylol. Einbettung in Damarlack. Amyloid ist hellblau; das übrige Gewebe mehr violett.

g) Toluidinblaufärbung von Harris.

Färben der in Alkohol gehärteten Präparate 3—24 Stunden lang in Karbol-Toluidinblaulösung. — Abspülen in Wasser. — Beizung, 1—2 Stunden lang, in gesättigter Lösung von gelbem oder rotem Blut-

laugensalz oder Ammoniummolybdat. — Abwaschen. — Kanadabalsam. Amyloid rot, übriges Gewebe in verschiedenen Nuancen blau.

h) Polychromes Methylenblau.

Die Färbung hat den Vorteil, daß die Metachromasie sich auch in Kanadabalsam erhält.

1) Färbung 10—15 Minuten.
2) Abspülen in Wasser.
3) Eintauchen in $^1/_2$-proz. Essigsäure 10—20 Sekunden.
4) Einbringen in konzentrierte, zur Hälfte mit Wasser verdünnte Alaunlösung 2—5 Minuten.
5) Abspülen in Alkohol absolutus $^1/_2$ Minute — Xylol-Balsam.

i) Methode von Birch-Hirschfeld.

1) Färben in einer 2-proz. spirituösen Bismarckbraunlösung (s. S. 56) 5 Minuten lang.
2) Abspülen in absolutem Alkohol.
3) Auswaschen in destilliertem Wasser, 10 Minuten lang.
4) Färben in 2-proz. Gentianaviolettlösung, 5—10 Minuten.
5) Auswaschen in angesäuertem Wasser: 10 Tropfen Essigsäure auf ein Uhrschälchen mit Wasser.
6) Einschluß in Lävulose.

Diese Methode gewährt eine sehr scharfe Abgrenzung der amyloid degenerierten Partien gegenüber dem anderen Gewebe, dessen Kerne braun gefärbt sind.

k) Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Diese ist zu empfehlen, wenn man das Verhalten der amyloiden Substanz zu den einzelnen Gewebsbestandteilen untersuchen will. Man erhält sehr klare Bilder, an denen man sich oft besser orientieren kann als an den einer spezifischen Amyloidreaktion unterworfenen Schnitten. Die amyloide Substanz färbt sich rosa, die Kerne der atrophischen Zellen sind auch in unmittelbarer Nähe der Amyloidschollen gut zu erkennen, während sie bei den Amyloidreaktionen hier oft verdeckt werden.

l) van Gieson'sche Färbung

ist ganz besonders geeignet, um die Beziehungen der Amyloidsubstanz, welche rosa bis braunrot gefärbt wird, zu den übrigen Geweben darzustellen und Amyloid von Hyalin zu unterscheiden.

m) Sudan oder Scharlach

färben bei langer Anwendung starker alkalisch-alkoholischer Lösungen Amyloid oft rosa.

## M. Fettsubstanzen.

### I. Neutralfette.

Die Untersuchung wird am besten an frischen Präparaten vorgenommen, entweder an isolierten Zellen oder an frischen Schnitten. Die Fettkörnchen, welche sich innerhalb der Zellen finden, zeigen charak-

teristische optische und chemische Eigenschaften. Ihr starkes Lichtbrechungsvermögen läßt sie in durchfallendem Lichte mit dunklem Rande erscheinen, während sie bei auffallender Beleuchtung infolge starker Lichtreflexion einen weißen Schimmer haben. Gegenüber chemischen Reagentien verhalten sie sich folgendermaßen:

1) Sie verschwinden auf Essigsäurezusatz nicht.

2) Sie sind resistent gegen dünne Kali- und Natronlauge (s. S. 11).

3) Auf Zusatz von 1-proz. Osmiumsäure werden sie schwarz gefärbt.

Auf dieser Schwarzfärbung beruht die Anwendung der Marchischen Methode und der Flemming'schen Flüssigkeit zum Nachweise des Fettes. Sie ist bedingt durch Reduktion von Osmiumtetraoxyd zu metallischem Osmium und kann durch Oxydationsmittel (Kaliumpermanganat, Wasserstoffsuperoxyd) wieder gebleicht werden.

Durch die Osmiumsäure werden Ölsäure und Olein geschwärzt, nicht aber chemisch reine Palmitin- und Stearinsäure, sowie deren Glykoside. Doch erfahren letztere meist bei nachfolgender Alkoholbehandlung eine sekundäre Osmierung.

4) Sie lösen sich auf Zusatz von Chloroform und Äther.

Will man diese letztere Reaktion anwenden, so muß man das Präparat zuerst durch absoluten Alkohol entwässern, dann eine Zeitlang Chloroform oder Äther einwirken lassen, diese wiederum durch Alkohol entfernen und schließlich in Kochsalzlösung untersuchen.

Zur Härtung ist der Alkohol nicht geeignet, weil er das Fett nach und nach auflöst. Bei Härtung in Müller'scher Flüssigkeit bleiben die Fetttröpfchen zwar erhalten, sie fließen aber teilweise zu größeren Tropfen zusammen. Dagegen erhält man sehr gute Resultate mit der Marchi'schen Härtungsmethode (s. unter Nervensystem). Diese kann man auch noch an Präparaten anwenden, die schon lange in Müller'scher Flüssigkeit gelegen haben, sowie auch an Formalinpräparaten.

Sehr empfehlenswert ist ferner die Härtung in Flemming'scher Lösung (s. S. 19), 4 Tage lang, danach sorgfältiges, bis 24 Stunden langes Auswässern, Nachhärtung je einen Tag in 30-proz., 60-proz., 96-proz. Alkohol und eventuell Celloidineinbettung. Wenn die Stücke nicht sehr sorgfältig ausgewaschen werden, so bilden sich schwarze Niederschläge; zur Vermeidung solcher empfiehlt außerdem Flemming noch, die Osmierung in einem dunklen Raume vorzunehmen. Man kann die Flemming'sche Lösung nachträglich auch noch auf Formalinpräparate einwirken lassen, entweder auf ganze Stückchen aus Formalin, oder auf Schnitte, die man mit dem Gefriermikrotom von Formalinpräparaten hergestellt hat. Die Präparate werden auf dem Gefriermikrotom oder einem anderen Mikrotom geschnitten und können mit Safranin (s. S. 57) gefärbt werden. Manchmal ist nebenbei zum Vergleich eine einfache Färbung mit Eosin von Nutzen.

Nach der Färbung kurzes Entwässern in absolutem Alkohol, Aufhellen in Öl und Einschluß in Kanadabalsam. Das zur Aufhellung benutzte Öl muß aus den Schnitten sehr sorgfältig entfernt werden. Terpentinöl ist möglichst zu vermeiden, auch längeres Verweilen in Xylol (z. B. bei der Paraffineinbettung), da beide Stoffe, ebenso wie Äther und Kreosot, das osmierte Fett lösen. Dasselbe wird nicht gelöst in

Alkohol, Chloroform und Nelkenöl. Zum Einschluß wählt man harten, über der Flamme flüssig gemachten Kanadabalsam, der schnell wieder erhärtet. In dem gewöhnlichen, dünnflüssigen Xylolkanadabalsam diffundieren die Fetttröpfchen manchmal zum Teil; aber auch bei Anwendung aller Vorsichtsmaßregeln kommt es vor, daß Marchi- oder Flemming-Präparate die Schwarzfärbung verlieren, oder daß die feinsten Fetttröpfchen zu großen Kugeln konfluieren, nachdem der Kanadabalsam längst vollständig erstarrt ist.

Zur Paraffineinbettung osmierter Präparate vermeidet man Xylol, und verwendet Chloroform, reines Benzin oder Petroläther.

Bei allen Präparaten, bei denen zur Fixierung und Schwarzfärbung des Fettes stärkere Osmiumsäurelösungen angewendet sind, müssen die Stücke, nachdem man sie aus der Osmiumsäure herausgenommen hat, und bevor man sie in Alkohol überträgt, sehr gründlich ausgewaschen werden. Im anderen Falle zieht, wie das namentlich Heidenhain hervorgehoben hat, der Alkohol aus dem Gewebe überschüssige Osmiumsäure und wahrscheinlich auch reduzierende Substanzen aus, so daß die Flüssigkeit mehr oder weniger schwarz erscheint, weil sich Osmiumsäure in feinsten Partikelchen ausscheidet. Was aber im Alkohol außerhalb des Präparates und um dasselbe geschieht, das kann sich, wie Heidenhain betont, auch in demjenigen Teil des Alkohols ereignen, der das Präparat durchtränkt. Das schwarze Metall bildet dann einen Beschlag auf den Geweben, auch da, wo von einem Fettgehalt nicht die Rede sein kann. Derartige Trugbilder werden aber vermieden, wenn man die überschüssige Osmiumsäure durch Auswaschen in reichlichen Mengen von Wasser vor dem Einlegen in Alkohol entfernt.

### 5) Sudan- und Scharlachfärbung.

In neuerer Zeit hat die Technik der Fettfärbung eine wesentliche Bereicherung erfahren durch die Anwendung von Anilinfarben. Unter diesen sind die folgenden beiden durch ihre intensive Rotfärbung am meisten in Gebrauch.

1) Sudan III (Benzol-Azobenzolazo-$\beta$-Naphthol) und

2) Scharlach R oder Fettponceau (Toluol-Azotoluolazo-$\beta$-Naphthol). Die Färbung beruht darauf, daß Fett ein ungleich besseres Lösungsmittel für diese Farbstoffe ist, als Alkohol und die Fetttröpfchen daher sich aus der alkoholischen Lösung mit Farbstoff beladen. Schon aus der Natur dieser Färbung als eines einfachen Lösungsvorganges folgt, daß das gefärbte Fett seine Empfindlichkeit gegen Alkohol usw. beibehält. Man muß daher vor und nach der Färbung den Kontakt mit stärkerem Alkohol vermeiden, so daß die gebräuchlichen Einbettungsmethoden versagen und wir die Färbung an frischem Material oder an Gefrierschnitten nach Formol, Formol-Müller, oder Müller-Härtung vornehmen müssen.

Auch die Farblösung darf nicht zu konzentrierten Alkohol enthalten; bei mehr als 80 Proz. muß das Verweilen der Schnitte schon beaufsichtigt werden und wir laufen Gefahr, kleine Fettmengen zu verlieren. Anderseits soll die Lösung für ihren Prozentgehalt an Alkohol möglichst gesättigt sein. Da schon geringe Verschiebungen der Konzentration eine Ausfällung des kristallischen Farbstoffs bewirken, müssen die Lösungen

gut filtriert sein, in geschlossenen Schalen verwendet werden und die Schnitte vor dem Hereinlegen und nach dem Herausnehmen 50-proz. Alkohol passieren, in dem man sie ordentlich herumschwenken muß. Stärker alkoholische Lösungen färben schneller; für konzentrierte Lösungen in 76—80-proz. Alkohol genügen etwa 30—10 Minuten. Kernfärbung mit Hämatoxylin kann man als Vor- und Nachfärbung anwenden; Nachfärbung hat den Vorteil, daß man das Fortschreiten der Fettfärbung bequemer unter dem Mikroskop kontrollieren kann. Auch Differenzieren in Salzsäure-Alkohol ist möglich, nur vermeidet man auch hier am besten stärkeren als 50-proz. Alkohol. Aus dem 50-proz. Alkohol nach der Färbung kommen die Schnitte in destilliertes Wasser, werden von hier am bequemsten direkt mit dem Objektträger aufgefangen, abgetrocknet und in Glyzerin, Lävulose oder Glyzeringelatine (s. S. 47) eingeschlossen.

Der Gang der Färbung ist etwa folgender:

1) Gefrierschnitte für 2—3 Minuten in 50-proz. Alkohol.
2) In 70—80-proz. alkoholische konzentrierte Sudan- oder Scharlachlösung. 10—30 Minuten.
3) Ordentliches Abspülen in 50-proz. Alkohol.
4) Destilliertes Wasser; eventuell mikroskopische Kontrolle oder Einschluß ohne Gegenfärbung oder
5) Hämatoxylinfärbung.
6) Destilliertes Wasser — Auffangen mit dem Objektträger, Abtrocknen — Einschluß in Glyzerin oder Lävulose.

Deckglastrockenpräparate fixiert man in Formol oder in Formoldämpfen und kann dann Sudan- oder Scharlachfärbung anwenden.

Sekrete und Exkrete kann man nach Rieder zu gleichen Teilen mit gesättigter Sudanlösung in 96-proz. Alkohol setzen und dann sedimentieren oder zentrifugieren.

Zur Erhöhung der Färbekraft dient nach Herxheimer Zusatz von Natronlauge. In folgender Lösung: Alkohol absol. 70,0, Aqu. dest. 10,0, 10-proz. Natronlauge 20,0, Fettponceau bis zur Sättigung, soll man mit 2—3 Minuten Färbung ausreichen. Analogen Zusatz empfiehlt Lubarsch für Sudan. Ebenso wird nach Herxheimer die Färbekraft bedeutend erhöht, wenn man den Fettfarbstoff in einer Mischung von Aceton und 70-proz. Alkohol zu gleichen Teilen löst. Färben 1—2 Minuten, dann Abspülen in 70-proz. Alkohol.

Blaufärbung des Fettes erreicht man nach Herxheimer mit einer konzentrierten Lösung von Indophenol in 70-proz. Alkohol. Vorfärbung mit Alaunkarmin; im übrigen ist die Methode dieselbe.

In konzentriert wässeriger Lösung von Nilblausulfat oder Neumethylenblau färbt sich nach Smith in Gefrierschnitten das Fett leuchtend rot (ca. 10 Minuten), während die Kerne dunkelblau und das Protoplasma hellblau wird. Fettsäuren erscheinen mehr oder weniger dunkelblau. Nach gründlichem Abspülen in Wasser erfolgt Einschluß in Glyzerin oder Glyzeringelatine. Schmorl empfiehlt Differenzieren in 1-proz. Essigsäure und gründliches Auswaschen in Wasser.

Über Kombination von Fett- und Elastinfärbung s. S. 72.

## II. Myelinsubstanzen.

Diese chemisch nicht einheitlichen, fettartigen Körper finden sich als Tropfen in manchen gesunden Zellen und bei pathologischen Prozessen. Vom Neutralfett unterscheiden sie sich durch folgende Reaktionen:

1) Sie sind doppelbrechend (Nachweis s. S. 5).
2) Gelegentlich scheiden sie sich in der Kälte in kristallinischer Form aus; bei Erwärmung erfolgt Lösung.
3) Sie färben sich mit Osmiumsäure weniger intensiv als Fett und sind auch nach der Osmierung leichter extrahierbar.
4) In dünnen wässerigen Neutrallösungen färben sie sich häufig rot.

## III. Fettsäuren und ihre Salze.

Für die Fettgewebsnekrose des Pankreas hatte Benda gezeigt, daß sich die Kristalle der freien Fettsäuren (büschelförmige Nadeln) und des fettsauren Kalkes in intensiv blaugrüne fettsaure Kupferverbindungen überführen lassen. Man härtet die Organstücke 2—4 Tage in der Weigert'schen Kupferchromalaunessigsäurebeize (s. unter Neurogliafärbungen) mit 10-proz. Formolzusatz, fertigt Gefrierschnitte an und färbt in Sudanlösung eventuell mit Hämatoxylinkernfärbung. Auch in reiner konzentrierter Kupferacetatlösung tritt die Reaktion ein. Durch Hämatoxylinfärbung tritt nach Fischler an diesen Stellen eine Kupferlackbildung ein. Fettsäuren und fettsaure Kalke werden in 10-proz. Formalin fixiert, fettsaures Natrium und Kalium dagegen gelöst. Will man letztere auch sichtbar machen, so müssen sie durch Zusatz von Calcium salicylicum bis zur Sättigung in die unlöslichen Kalksalze übergeführt werden. Vergleichspräparate mit und ohne diesen Zusatz lassen den Gehalt an K und Na Salzen der Fettsäuren erkennen. Die Behandlung erfolgt nach Fischler folgendermaßen:

1) Fixierung in 10-proz. Formol (für Fettsäuren und fettsauren Kalk) mit Calcium salicylicum-Zusatz (für Na- und K-salze der Fettsäuren).
2) Beizen der Gefrierschnitte 2—24 Stunden im Brutschrank in konzentrierter Lösung von Cuprum aceticum.
3) Auswaschen in destilliertem Wasser.
4) Färben mindestens 20 Minuten in gut färbendem Weigert-schen Hämatoxylin. (Hämatoxylin 1,0. Alkohol absol. 10,0. Aqua dest. 10,0. Concentr. Lithionkarbonatlösung 0,1.)
5) Differenzieren in stark verdünnter Weigert'scher Differenzierungsflüssigkeit (Rotes Blutlaugensalz 2,5, Borax 2,0, Aqua dest. 100,0) bis die roten Blutkörperchen entfärbt sind.
6) Gründliches Auswaschen in destilliertem Wasser.
7) Färbung des Neutralfettes mit Sudan — Glyzerin, oder Alkohol — Xylol — Balsam.

Fettsäuren und ihre Salze bis in die kleinsten Tröpfchen tiefschwarz.

Auch Kalk und Eisen bilden einen Hämatoxylin-Lack, der aber auch schon ohne vorhergehende Kupferbehandlung auftritt. Im Zweifelsfalle Auflösen des Kalks mit verdünnter Salzsäure, Nachweis des Eisens mit der Berliner Blaureaktion. Außerdem färben sich noch die Granula

der eosinophilen und Mastzellen, die aber zu Verwechslungen keinen Anlaß geben.

Fettsaurer Kalk ist in wässeriger Salzsäure nicht löslich, wohl aber in salzsäurehaltigem Äther-Alkoholgemisch.

## N. Cholesterin.

Seine Kristalle bilden rhombische, flache Tafeln, die in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien unlöslich, dagegen in Äther, Chloroform, Benzol, und in flüchtigen und fetten Ölen leicht löslich sind. Konzentrierte Schwefelsäure färbt das Cholesterin rot und in Gegenwart von Jod zuerst blau, dann grün und rot. Zur Anstellung der mikroskopischen Reaktion versetzt man das Präparat auf dem Objektträger mit etwas verdünnter Schwefelsäure, eventuell unter vorherigem Zusatz von Lugol'scher Lösung, und erhitzt.

## O. Glykogen.

Das Glykogen ist in Wasser löslich, in den einzelnen Organen allerdings in verschiedenem Maße. In Alkohol ist es unlöslich und wird durch ihn aus seinen Lösungen gefällt. Um daher sicher alles Glykogen zu konservieren, muß man kleine Organteile, z. B. Nieren von Diabetikern, Geschwülste, Entzündungsprozesse in absolutem Alkohol fixieren. Da sich in manchen Organen das Glykogen sehr rasch nach dem Tode zersetzt, ist es von großer Wichtigkeit, das Gewebe möglichst lebensfrisch in Alkohol zu bringen. Übrigens ist nach Best bei intakter Zellmembran die Diffusion des Glykogens nicht so stark, so daß man mit Vorsicht auch kurzdauernde Fixierung in wässerigen Flüssigkeiten anwenden kann. Best hat auch gezeigt, daß durch Celloidineinbettung Glykogen unlöslicher wird, so daß man an Celloidinschnitten auch wässerige Farbstofflösungen anwenden kann. Nach Arnold kann man auch Paraffinschnitte verwenden, die man aufklebt, entparaffiniert, in Äther-Alkohol abspült, und für 1—2 Stunden in ganz dünne Celloidinlösung bringt; man läßt das Celloidin ablaufen und taucht die Objektträger in 80-proz. Alkohol, bis das Celloidinhäutchen fest ist; dann kann man in gewöhnlicher Weise färben. Dagegen wird alles Glykogen, ob gefärbt oder nicht, auch nach der Einbettung durch Speichel schließlich gelöst und wir besitzen hierin ein wertvolles Mittel, um bei nicht ganz sicherer Färbung eine Entscheidung herbeiführen zu können. Ferner ist die Jodreaktion und die Färbbarkeit in Best'schen Karminlösungen charakteristisch. Die wichtigsten Merkmale des Glykogens sind also:

1) Frisch homogene Tropfen und Schollen.
2) Löslichkeit in Wasser, Unlöslichkeit in Alkohol.
3) Spaltung durch Speichel.
4) Braunfärbung mit Jod.
5) Rotfärbung in Best'schem Karmin.

Die beiden letzten Farbreaktionen sollte man stets einander kontrollieren lassen, da man bei Anwendung nur einer Methode Täuschungen zum Opfer fallen kann.

### I. Jodreaktionen.

Deckglastrockenpräparate, z. B. Blut, läßt man nach Ehrlich in einem verschlossenen, Jodkristalle enthaltenden Gefäß so lange, bis sie eine dunkelbraune Färbung angenommen haben und bringt sie dann sofort auf einen Objektträger mit einem Lävulosetropfen.

Feuchte Präparate, z. B. Blut- oder Gewebsschabsel kann man im hohlen Objektträger nach Vaselinumrandung der Jodräucherung aussetzen, indem man einen minimalen Jodkristall auf den Boden bringt.

Schnitte untersucht man nach Ehrlich, ohne sie in Berührung mit Wasser zu bringen, in einer dünnen Jodjodkalilösung, die mit so viel Gummi arabicum versetzt ist, daß sie eine zäh syrupöse Flüssigkeit bildet.

Ebenso kann man die Schnitte in Glyzerin untersuchen, dem die Hälfte seines Volumens Lugol'sche Lösung beigemischt ist. (Barfurth.) Diese Untersuchungsmethode hat den Vorteil, daß die Schnitte zugleich stark aufgehellt werden; doch sind die Präparate weniger haltbar.

Die besten Präparate erhält man mit der Jodmethode von Langhans, die zur Aufhellung und Konservierung Origanumöl verwendet. Man darf aber die vor dem Einlegen in Origanumöl nötige Entwässerung der Schnitte nicht in reinem absolutem Alkohol vornehmen, der das Jod sofort auszieht, sondern in einer Mischung von 4 Teilen absoluten Alkohols und 1 Teil offizineller Jodtinktur. Das Verfahren ist demnach folgendes:

1) Härtung, möglichst frisch in absolutem Alkohol. Celloidinschnitte.
2) Färben in Lugol'scher Lösung.
3) Entwässern in einer Mischung von Jodtinktur 1 Teil, Alkohol absolut. 4 Teile.
4) Aufhellen und Konservieren in Origanumöl.

Man kann auch Kernfärbung mit Hämatoxylin oder alkoholischem Karmin vorhergehen lassen. Driessen kombiniert Kernfärbung und Jodreaktion folgendermaßen:

1) Färbung in alkoholischer konzentrierter Cochenillelösung oder P. Mayer'schem saurem Karmin.
2) Entfärben in 96-proz. Alkohol.
3) Alkohol absolutus 3 Minuten.
4) Jod-Karbolxylol 3—5 Minuten (Lugol'sche Lösung und Karbolxylol werden zu gleichen Teilen in einem Reagenzglas tüchtig geschüttelt, das jodhaltig gewordene Karbolxylol schwimmt oben und wird mit der Pipette entnommen).
5) Bei Überfärbung Ausspülen in Karbolxylol.
6) Kanadabalsam.

### II. Best'sche Karminfärbungen.

Sie ergeben so schöne und sichere, zudem noch haltbare Präparate (während alle Jodfärbungen nach einiger Zeit verblassen), daß außer den Jodreaktionen kaum andere Glykogenfärbungen nötig sind. Deshalb sollen die Methoden von Lubarsch (Modifikation der Weigert'schen Fibrinmethode, Virchow's Archiv, Band 135), von A. Fischer (Tannin-Safraninfärbung, Anatom. Anzeiger 1905), Cresi (Resorcin-Fuchsinfärbung. Atti della R. Accad. med.-chir. di Napoli 1903) nur erwähnt werden.

a) Ammonium-Lithiumkarminfärbung von Best.

Man stellt sich folgende Karminlösung her:

| | |
|---|---|
| Karmin | 1,0 |
| Ammon. chlorati | 2,0 |
| Lithion carbon. | 0,5 |
| Aqua dest. | 50,0. |

Das Gemisch wird einmal aufgekocht, nach dem Erkalten wird Liqu. ammonii caustici 20,0 zugesetzt. Im Dunkeln aufbewahrt, ist die Lösung vom 2. bis 3. Tage ab brauchbar und einige Wochen (im Sommer kürzer) haltbar. Filtriert wird sie nur direkt vor dem Gebrauch. Die Färbung gestaltet sich dann folgendermaßen:

1) Vorfärben mit Hämatoxylin; eventuell Differenzieren in Salzsäure-Alkohol ist möglich (Vorfärbung ist unbedingt nötig!).
2) Wasser.
3) $^3/_4$—1 Stunde Färben in einer frisch hergestellten Mischung von obiger Karminlösung 2 Teile, Liquor Ammonii caustici 3 Teile; Methylalkohol 6 Teile. Diese Mischung (nicht filtrieren!) ist immer frisch herzustellen und sofort zu benutzen. Man soll nur wenige Schnitte auf einmal darin färben.
4) Entfärben in mehrfach erneuerter Mischung von 2 Teilen Methylalkohol, 4 Alkohol absolutus, 5 Teilen Wasser — einige Minuten.
5) Alkohol 80-proz., Alkohol absol. — Öl — Balsam.

b) Kaliumkarminfärbung von Best.

1) Vorfärben mit Böhmer'schem Hämatoxylin oder Hämalaun, stark, eventuell mit nachträglicher Salzsäurealkoholdifferenzierung.
2) Daraus kommen die Schnitte 5 Minuten in

| | |
|---|---|
| Kaliumkarminlösung | 2,0 |
| Liqu. ammon. caustic. | 3,0 |
| Methylalkohol | 3,0. |

Diese Mischung hält sich in verschlossener Flasche nur wenige Tage, im Sommer kürzer als im Winter.

3) Differenzieren in

| | |
|---|---|
| Alkohol absol. | 80,0 |
| Methylalkohol | 40,0 |
| Aqua dest. | 100,0 |

einige (1—3—5) Minuten, bis die gewechselte Differenzierungsflüssigkeit klar bleibt.

4) 80-proz. Alkohol, abs. etc. Kanadabalsam.

Die Kaliumkarminlösung ist sofort gebrauchsfähig und wird folgendermaßen hergestellt:

Karmin 2,0, Kalium carbonic. 1,0, Chlorkalium (KCl) 5,0 werden mit 60,0 Aqu. dest. einige Minuten gekocht (schäumt, Vorsicht vor Überkochen!) und nach Erkalten 20,0 Liqu. ammon. caustici zugesetzt. Diese Kaliumkarminlösung hält sich in gut verschlossener Flasche für Glykogenfärbung etwa 2 Monate im Winter, 3 Wochen im Sommer brauchbar. Filtriert wird vor Gebrauch.

Die Kerne sind blau, das Glykogen intensiv und leuchtend rot gefärbt. Sehr derbes Bindegewebe nimmt manchmal auch einen roten

Ton an, der jedoch nie so intensiv ist; ferner färben sich die Sekretionszellen des Magens, die corpora amylacea im Nervensystem und osteoides Gewebe vor der Verkalkung; inkonstant außerdem das Mucin in Becherzellen und die Körnelung der Mastzellen. Im Zweifelsfalle Vergleich mit Jodpräparaten oder Prüfung mit Speichel, der auch das gefärbte Glykogen zum Schwinden bringt. Reines Glykogen gibt die Färbung nicht; wahrscheinlich beruht sie auf der Anwesenheit des Glykogenträgers.

## P. Kalk.

Die Ablagerung von Kalksalzen verrät sich durch glänzende Körner, welche im durchfallenden Lichte dunkel, in auffallendem weißglänzend erscheinen. Durch Zusatz von Säuren, z. B. 5-proz. Salzsäure, die man dem Schnitt vom Rande des Deckglases her zufließen läßt, wird der Kalk aufgelöst, so daß die vorher undurchsichtigen Partien durchsichtig werden. Dabei löst sich der kohlensaure Kalk unter Bildung von Gasbläschen, der phosphorsaure ohne solche. Bei Schwefelsäurezusatz bilden sich die zierlichen Gipsnadeln. Oft ist es vorteilhaft, diese Reaktion in 40-proz. Alkohol vorzunehmen, da kleine Gipsmengen in Wasser löslich sind. Bei Zusatz von Salzsäure und oxalsaurem Ammonium bilden sich Oktaëder von oxalsaurem Kalk.

### I. Hämatoxylinfärbungen.

Der Kalk hat die Eigenschaft, sich auch schon in ganz kleinen Mengen mit Hämatoxylin charakteristisch dunkelblau, manchmal etwas rötlichblau zu färben; ist dies auch keine mikrochemische Reaktion, so genügt sie doch meist zur Erkennung der Verkalkung. Da auch Eisen- und Magnesiasalze Hämatoxylinfärbung zeigen, muß man diese zum sicheren Kalknachweis entfernen. Man erreicht dies nach Roehl folgendermaßen:

1) Einlegen in konzentrierte oder zur Hälfte verdünnte wässerige Oxalsäure, die Kalk nicht, wohl aber Eisen löst, etwa $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde, bis ein Kontrollschnitt keine Eisenreaktion mehr gibt.
2) Auswaschen in destilliertem Wasser.
3) Färben 5—10 Minuten in 1-proz. wässeriger Hämatoxylinlösung, die nicht zu frisch bereitet und nicht zu alt sein darf.
4) Differenzieren in destilliertem Wasser, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt sind, bis der Schnitt völlig farblos und nur die kalkhaltigen Partien noch gefärbt sind.
5) Abspülen in Wasser.
6) Nachfärbung in Safranin, Alkohol, Xylol, Balsam.

Phosphorsaurer Kalk läßt sich nach Roehl färben:

1) Schnitte auf 5 Minuten in ammoniakalische Kupfersulfatlösung, die Ammoniak in möglichst geringem Überschuß enthält (Bildung von phosphorsaurem Kupfer).
2) Gründlich Auswaschen in destilliertem Wasser.
3) 15 Minuten in Weigert's Hämatoxylin (s. S. 84).
4) Differenzieren in zur Hälfte verdünnter Weigert'scher Differenzierungsflüssigkeit.
5) Wasser, Alkohol, Xylol, Balsam.

### II. Alizarinfärbung nach ROEHL.

1) Behandlung mit Oxalsäure wie oben.
2) Auswaschen in destilliertem Wasser.
3) Einlegen 2—5 Minuten in folgende Farbstofflösung:
   Eine Messerspitze der 10-proz. im Handel befindlichen Alizarinpaste (Höchst) wird in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt, und 2—3 Tropfen einer 33-proz. Sodalösung hinzugegeben, Filtrieren.
4) Auswaschen in Wasser.
5) Alkohol, Xylol, Balsam.

Kalk intensiv violett, Zellkerne schwach in etwas anderem Farbenton gefärbt. Die Präparate blassen häufig ab.

### III. Metallfärbungen.

VON KOSSA wies nach, daß Calciumphosphat mit Höllensteinlösung durch Bildung von phosphorsaurem Silber gelb gefärbt wird. Im Lichte tritt bald durch Reduktion eine Schwarzfärbung ein. Hiermit gelingt es, die feinsten Kalkablagerungen nachzuweisen. Ein Nachdunkeln der Schnitte kann durch Behandlung mit unterschwefligsaurem Natron vermieden werden. Die Färbung gestaltet sich dann folgendermaßen:

1) Vorfärbung in Alaunkarmin (oder Nachfärben in Safranin).
2) 1—5-proz. Lösung von Argentum nitricum in hellem Tageslichte 30—60 Minuten.
3) Auswaschen in destilliertem Wasser, ev. Entfernen des überschüssigen Silbersalzes durch Eintauchen der Schnitte in eine 5-proz. Lösung von unterschwefligsaurem Natron.
4) Entwässerung — Öl — Balsam.

STOELTZNER bringt die Schnitte aus destilliertem Wasser in ein zweites Schälchen mit destilliertem Wasser, dem einige Tropfen einer Argentum nitricum-Lösung zugesetzt sind, nach Abspülen in destilliertem Wasser überträgt man die Schnitte in eine dünne Lösung eines photographischen Entwicklers, z. B. Pyrogallol, in der augenblicklich die Silberfärbung der verkalkten Stellen eintritt.

STOELTZNER (VIRCHOW's Archiv, Band 180) zeigte, daß sich mit einer großen Reihe von Metallverbindungen (Blei, Kupfer, Eisen) Kalkfärbungen erzielen lassen.

Der sichere mikrochemische Nachweis der Phosphorsäure im Kalk gelingt nach ROEHL durch Eintauchen der dünnen Schnitte wenige Sekunden lang in eine salpetersaure Lösung von molybdänsaurem Ammon (1-proz.). Auswaschen in salpetersäurehaltigem Wasser und Reduktion durch Zinnchlorür. Der phosphorsaure Kalk wird intensiv blau; doch färbt sich oft das Gewebe zu intensiv mit.

Über den Nachweis des fettsauren Kalkes s. S. 84.

## Q. Pigmente.

### I. Hämaglobinogene Pigmente.

In hämorrhagischen Herden befindet sich einmal Hämatoidin, sowohl amorph wie in Form von rhombischen Täfelchen. Dasselbe ist an seiner orangegelben oder mehr roten Farbe leicht zu erkennen.

Daneben kommen aber amorphe gelbe bis schwarzbraune Schollen vor, die man ihres Eisengehaltes wegen unter dem Namen „Hämosiderine" zusammenfaßt.

Die Hämosiderine resp. ihr Eisengehalt werden nachgewiesen:

a) durch die **Berliner Blaureaktion** mit Ferrocyankaliumlösung und Salzsäure, indem durch das Ferrocyankalium aus den Eisenoxydsalzen Berliner Blau (Eisenoxydsalz der Ferrocyanwasserstoffsäure) gebildet wird.

Nach Falkenberg ist am besten Alkoholfixierung, nur wenig schlechter Formalin-Alkohol oder Sublimat. Formalinhärtung beeinträchtigt die Reaktion etwas stärker. Chromsäurehaltige Fixierungsflüssigkeiten sind zu vermeiden. In Alkohol fixierte Stücke kann man mit Formalin nachbehandeln und dann auf dem Gefriermikrotom schneiden.

Zur Anstellung der Reaktion bringt man die Schnitte für einige Minuten in eine 2-proz. wässerige Ferrocyankaliumlösung und von da in Glyzerin, dem $^1/_2$-proz. Salzsäure zugesetzt ist. Die Hämosiderine nehmen dann eine deutlich blaue Farbe an.

Will man Dauerpräparate herstellen mit gleichzeitiger Kernfärbung, so verfährt man in folgender Weise: Man setzt der gewöhnlichen Lithionkarminlösung (s. S. 54) einige Tropfen Ferrocyankaliumlösung zu und behandelt entweder in salzsäurehaltigem Glyzerin nach, oder man wäscht in Salzsäurespiritus (s. S. 46) aus, überträgt in Wasser, entwässert in Alkohol und schließt in Kanadabalsam ein.

Besonders zu empfehlen ist, sowohl was die Kernfärbung wie die Ausführung der Eisenreaktion betrifft, das Verfahren von H. Stieda:

1) Vorfärbung, mehrere Stunden lang, in Lithionkarminlösung.
2) Kurzes Abspülen in destilliertem Wasser.
3) Übertragen für 4—6 Stunden lang in 2-proz. Ferrocyankaliumlösung.
4) Übertragen in 1-proz. Salzsäurespiritus für 6—12 Stunden.
5) Kurzes Abspülen in Wasser, Spiritus, Alkohol abs., Hopfenöl, Kanadabalsam.

Man kann übrigens auch zuerst die Eisenreaktion mit Ferrocyankalium und Salzsäureglyzerin anstellen, dann die Schnitte auswaschen und mit Alaunkarmin nachfärben. Auch kann man die Reaktion in einem Gemisch von Ferrocyankalium und Salzsäure vornehmen.

b) Nachweis durch **Schwefelammonium.**

1) Einlegen der Schnitte in frisch bereitete Schwefelammoniumlösung, 5—20 Minuten lang, bis sie eine dunkelgrüne oder schwarzgrüne Farbe angenommen haben.
2) Rasches Abspülen in Wasser.
3) Untersuchung und Konservierung in Glyzerin, welches schwach schwefelammoniumhaltig ist.

Das Eisen tritt dann in Gestalt von kleinen schwarzen oder schwarzgrünen Körnchen hervor.

Man kann die Präparate auch aus dem Wasser in Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam bringen. Der Kontakt mit Wasser darf nach Quincke nicht lange dauern, weil bei Entfernung sämtlichen Schwefelammoniums das gebildete Schwefeleisen oxydiert und entfärbt wird.

Infolge der Oxydation verlieren überhaupt feine Körnchen sehr bald ihre grüne Farbe wieder. Frisch zubereitetes Schwefelammonium ist nach Quincke nicht so gut, wie das ältere, gelb gewordene der Laboratorien. Größere Konzentration der Lösung oder Zusatz von etwas Ammoniak beschleunigt manchmal den Eintritt der Reaktion.

In neuerer Zeit hat Zalewski einige Modifikationen der Ferrocyankalium- und Schwefelammoniumreaktion angegeben. Zunächst empfiehlt er, die Reaktionen nicht an einzelnen Schnitten, sondern an kleinen Stückchen, entsprechend der Methode der Durchfärbung, anzustellen.

Die Ausführung ist dann folgende:

a) Schwefelammonium.

1) Konservierung der Stückchen, 24 Stunden lang in 65-proz. Alkohol.
2) Härtung, 24 Stunden lang in 96-proz. Spiritus, dem einige Tropfen starkes, gelbes Schwefelammonium zugesetzt sind; von Zeit zu Zeit umzuschütteln!
3) Härtung in absolutem Alkohol, der mit einigen Tropfen Schwefelammonium versetzt ist.
4) Schneiden usw.

Der Alkohol soll das Gefäß bis zum Rand füllen, um den oxydierenden Einfluß der Luft auszuschließen. Korkpfropfen dürfen zum Verschluß nicht angewandt werden, weil sie schon an und für sich mit Schwefelammonium eine Eisenreaktion geben. In schwefelammoniumhaltigem Alkohol können die Stücke lange Zeit aufbewahrt werden.

b) Gelbes Blutlaugensalz.

1) Konservierung der Stückchen, 24 Stunden lang, in 65-proz. Alkohol.
2) Übertragung in 1-proz. Lösung von gelbem Blutlaugensalz in 96-proz. Spiritus, 2—3 Tage lang.
3) Übertragung in 1-proz. Lösung von gelbem Blutlaugensalz in 65-proz. Spiritus.
4) Übertragung in 1—2-proz. Salzsäurespiritus. (Spiritus = 96-proz.) 2—3 Tage lang.
5) Schneiden usw. Nachträgliche Karminfärbung gelingt sehr gut.

Die Behandlung mit 65-proz. Spiritus (unter 3) wird eingeschoben, um das spätere Eindringen der Salzsäure zu erleichtern. Die mit gelbem Blutlaugensalz behandelten Stücke eignen sich besser zur nachträglichen Färbung als die mit Schwefelammonium behandelten.

Hall hat die Beobachtung gemacht, daß das Eisen oft schon bei der Manipulation der Härtung, des Auswaschens usw. den Geweben entzogen wird. Er empfiehlt daher als Härtungsflüssigkeit, welche das Eisen in einen unlöslichen Zustand überführt; für Leber, Milz usw. Schwefelammonium 30,0, Alkohol absolutus 70,0, für den Darm Schwefelammonium 5 ccm, absoluten Alkohol 70 ccm, Wasser 25 ccm. In dieser Lösung bleiben die kleinen Stückchen 24 Stunden, dann 70—80—90-proz. und absoluter Alkohol. Die anfänglich grünlich gewordenen Gewebsstückchen verbleichen bei der Weiterbehandlung wieder, weil das FeS in $Fe(OH)_2$ umgewandelt wird. Da dieses schwer sichtbar ist, so muß man für Dauerpräparate nun noch die Reaktion

mit gelbem Blutlaugensalz oder nochmals die Schwefelammoniumreaktion (s. oben) anwenden.

In analoger Weise, wie gelbes Blutlaugensalz, kann man für Eisenoxydulverbindungen auch rotes Blutlaugensalz (Blaufärbung durch Turnbulls Blau) und für Eisenoxydverbindungen auch Rhodankalium (Blutrotfärbung durch Eisenrhodanid) anwenden, jedesmal mit nachfolgender Salzsäurebehandlung.

Wenn man auf Eisen untersuchen will, darf man natürlich keine Stahlnadel anwenden und muß überhaupt den Kontakt mit eisenhaltigen Gegenständen sorgfältig vermeiden.

Quincke hat als Nachteil der Ferrocyankaliummethode angegeben, daß sie das Eiweiß stark koaguliert und leicht in die Umgebung diffundiert. Dieser letztere Umstand ist von geringerer Bedeutung, wenn man die Entstehung der Reaktion in salzsäurehaltigem Glyzerin direkt unter dem Mikroskop verfolgt.

Andererseits darf nicht unbeachtet bleiben, daß Schwefelammonium ähnliche Niederschläge, wie mit Eisen, noch mit einer ganzen Reihe von anderen Metallen macht, von denen ein praktisches Interesse im vorliegenden Falle namentlich salpetersaures Silber, Blei und Quecksilber haben dürften.

Manchmal mag es deshalb von Vorteil sein, beide Reaktionen nebeneinander in Anwendung zu ziehen.

Zu bemerken ist ferner, daß nicht alle Pigmente, auch wenn sie zweifellos Eisenverbindungen darstellen, die genannten Reaktionen geben. Einmal kann die Verbindung des eisenhaltigen Pigments mit dem Gewebe eine derartige sein, daß eine Reaktion ausbleibt (z. B. Hämoglobin); und dann scheinen auch die Pigmente nur in einem gewissen Stadium die Eisenreaktion zu geben. Bei ganz frischen Pigmenten und ebenso bei ganz alten tritt sie nicht ein.

Zur gleichzeitigen Darstellung von oxydischem und oxydulischem Eisen verwendet man die Schwefelammoniumbehandlung mit nachfolgender Turnbulls-Blau-Reaktion.

1) Behandlung der Schnitte einige Minuten oder länger in Schwefelammonium.
2) Abspülen in Wasser.
3) Für einige Minuten in 20-proz. Ferricyankalilösung (rotes Blutlaugensalz), der einige Tropfen dünner Salzsäure zugesetzt sind.
4) Abspülen in Wasser, event. Karminfärbung, Alkohol, Xylol, Balsam.

Will man einfach die Lage des Pigments studieren, so eignen sich für die Schnittfärbung am meisten rote Farbstoffe (Boraxkarmin, Alaunkarmin) weil sich diesen gegenüber das Pigment besser abhebt. Lithionkarmin ist zu vermeiden, weil es die Berlinerblaureaktion schädigt.

### II. Autochthone Pigmente.

1) Gallenfarbstoffe werden an ihrer gelben Farbe erkannt, die in Formol und Sublimat in grün übergeht. Man kann die Gmelin'sche Reaktion unter dem Mikroskop anstellen, indem man unter dem Deckglas einen Tropfen Salpetersäure, die etwas

salpetrige Säure enthält, durchsaugt; es entstehen grüne, rote und blaue Farbenringe. Oft ist es zweckmäßig, die Gewebe vorher mit Kalilauge zu behandeln. Beim Ikterus der Neugeborenen findet man in den meist mit Harnsäure vermischten Bilirubrin-(Hämatoidin)-Infarkten kristallinisches Bilirubrin in Form rhombischer Täfelchen oder als Gruppen von feinen Nadeln. Bei Erwachsenen sind sie bei akuter Leberatrophie und perniziöser Anämie ebenfalls gefunden. Bei diesen Erkrankungen und bei Ikterus neonatorum findet man dieselben Kristalle auch im Leichenblut, bei mazerierten Früchten oft in allen vom Blutfarbstoff durchtränkten Geweben.

2) **Abnutzungspigmente.** Sie erscheinen im ungefärbten Präparat gelbbräunlich bis braun und treten bei einfachen Kernfärbungen (Hämatoxylin, Alaunkarmin) meist deutlich hervor. Sie besitzen Fettgehalt und färben sich daher mit Sudan und Fettponceau und ergeben die Osmiumsäurereaktion, wenn auch meist schwächer als die reinen Fette. Durch Alkoholbehandlung wird die Reaktion meist nur abgeschwächt, während nach Äthereinwirkung die Fettfärbung verschwindet. Solche Pigmente finden sich z. B. im Herzmuskel, Leber, Nebennieren, Samenblasenepithel, Hoden, Ganglienzellen.

3) Das **Pigment der glatten Muskulatur** hat frisch eine ähnliche Farbe, ist aber fettfrei.

4) Das **Luteïn** ergibt mit Jodjodkalium leichte Blaufärbung. Saugt man unter dem Deckglas konzentrierte Schwefelsäure hindurch, so färbt sich das Pigment erst blaugrünlich, dann leicht blau. (Es steht dadurch den echten pflanzlichen Lipochromen nahe, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure tiefblau färben, wobei meist kleine blaue Lipocyankristalle entstehen. Durch Jodjodkalium werden sie grünlich.) Das Luteïn verliert auch durch lange Ätherbehandlung nicht seine Fettfärbung.

4) **Melanine.** Sie sind im frischen Präparat dunkler gefärbt, als die bisher besprochenen, braun bis schwarz, geben keine Eisen- und keine Fettreaktion. Zur Unterscheidung von Hämosiderinen kann man nach Unna auch folgende Methoden anwenden:

1) Karbolfuchsinfärbung. Entfärbung in konzentrierter Tanninlösung. Hämosiderin rot, Melanin entfärbt.

a) Polychrome Methylenblaufärbung. Tanninentfärbung. Hämosiderin blauschwarz, Melanin hellgrün.

## III. Exogene Pigmente.

**Anthrakotisches** Pigment erscheint tiefschwarz, knorrig verästelt. Es ist außerordentlich widerstandsfähig, auch gegen konzentrierte Schwefelsäure. Zwischen dem Kohlepigment finden sich manchmal ebenfalls resistente farblose Kieselstaubsplitter.

Körnige unlösliche **Farbstoffe,** die mit der Atemluft oder durch Tättowierung in die Gewebe gelangen, erscheinen oft im durchfallenden Licht dunkel, während sie bei auffallendem Lichte in ihrer Eigenfarbe aufleuchten.

**Exogenes Eisen,** das mit der Atemluft in Staubform aufgenommen, oder von eisernen Fremdkörpern in die Umgebung gedrungen ist, kann mit den Eisenreaktionen (s. S. 90) nachgewiesen werden.

In seltenen Fällen kann man in der Umgebung kupferner Fremdkörper (z. B. im Auge) den Kupfernachweis ebenso durch Ferrocyankalium und Salzsäure führen. Es entsteht Braunfärbung durch Ferrocyankupfer.

### IV. Entpigmentierung.

1) Durch Oxydationsmittel. So wirkt Chlor in statu nascendi. Man gießt auf einige Kristalle chlorsaures Kali 2 oder 3 Tropfen Salzsäure, und sobald sich Chlor zu entwickeln beginnt, 70-proz. Alkohol darauf. In diese Mischung eingelegt, wird das Pigment in 1—2 Tagen zerstört. Ebenso wirken Chlorwasser und Brom in wässerigen Lösungen. Ferner kann Pigment gebleicht werden durch Wasserstoffsuperoxyd (3- bis 10-proz. Lösung) oder Kaliumpermanganat (1 : 3000). Man reduziert die Objekte nach der Behandlung wieder mit $^1/_3$-proz. Oxalsäure oder Chromogen. Auch Natrium carbonicum, Calcar. chlorat. āā 12,5 Aqu. dest. 100,0 wird, eventuell in Verdünnung, besonders für Melanine gebraucht.
2) Durch Reduktion mit schwefliger Säure in alkoholischer Lösung.
3) Durch Lösung in Mineralsäuren (Salz- oder Salpetersäure) und Natronlauge in alkoholischer Lösung lassen sich besonders die eisenhaltigen Pigmente entfernen.

---

Zehntes Kapitel.

## Untersuchung einiger pathologischer Prozesse.

### A. Die Nekrose.

Nekrotische Herde lassen sich, falls sie mit bloßem Auge erkennbar und ihre Bestandteile isolierbar sind, oft mit Vorteil frisch untersuchen; man streicht mit dem Messer über den nekrotischen Herd und verteilt die an der Messerklinge haftende nekrotische Masse in Wasser oder in Kochsalzlösung, oder man zerzupft kleine herausgeschnittene Stückchen in denselben Flüssigkeiten. Es ist dieses Verfahren z. B. anwendbar bei nekrotischen Herden in Gehirn, Leber, Herz, Muskeln und Lunge.

Nekrosen einzelner Zellen oder kleiner Zellkomplexe müssen an Schnitten untersucht werden. Es eignet sich sowohl Härtung in Alkohol oder Formalin wie in MÜLLER'scher Flüssigkeit. Immer ist es ratsam, die Präparate in Celloidin einzubetten, weil sonst Teile des nekrotischen Herdes leicht ausfallen können. Zur Färbung dienen die gebräuchlichen Kernfärbemittel: Hämatoxylin, Alaunkarmin, Lithionkarmin. Da in den nekrotischen Herden die Zellen und ihre Kerne zu Grunde gegangen sind, so werden sie durch Kernfärbemittel nicht mehr gefärbt und heben sich daher von ihrer stärker gefärbten Umgebung durch ihre blasse Farbe ab. Es kommt aber auch manchmal in den nekrotischen Herden zu einer diffusen, nicht differenzierten

Färbung. Außerdem bemerkt man oft innerhalb der Nekrosen unregelmäßig gestaltete und ungleich große Körner, die den Farbstoff ganz intensiv aufnehmen und zum Teil als Reste von zerfallenen Kernen aufzufassen sind.

Durch Karmin oder Eosin lassen sich nekrotische Massen diffus und oft intensiv färben. Zur Unterscheidung von einer einfachen Gerinnung resp. Fibrinbildung dient die Weigert'sche Fibrinfärbung (s. S. 74), die bei Nekrosen negativ ausfällt. Bei Eklampsie zeigen die Lebernekrosen oft Fibringehalt.

Am Rande von Nekrosen wendet man oft mit Vorteil Fett- und Glykogenfärbungen an.

Bei Nekrose des Fettgewebes mit Verdauung durch Pankreassaft entstehen Fettsäuren und fettsaurer Kalk, die mit den S. 84 angegebenen Methoden untersucht werden können.

## B. Einfache Atrophie und Pigmentatrophie.

Leicht isolierbare Gewebsbestandteile können an Zerzupfungspräparaten untersucht werden, z. B. Nerven und Muskeln; eventuell kann man sie, um die Isolierung der Teile zu erleichtern, 24 Stunden lang in $^1/_3$ Alkohol oder eine andere Isolationsflüssigkeit (s. S. 9) bringen. Durch Zusatz von Essigsäure wird das Blut noch deutlicher. Einen besseren Einblick erhält man durch Untersuchung gefärbter Schnitte von gehärteten Präparaten. Zur Färbung empfiehlt sich, bei Pigmentatrophie einfache Kernfärbung mit Karmin oder Hämatoxylin. Untersuchung des Pigments s. S. 93.

## C. Trübe Schwellung.

Die Untersuchung wird am besten frisch an isolierten Zellen vorgenommen, welche durch Abschaben mit der Messerklinge oder durch Zerzupfen aus ihrem Zusammenhang herausgelöst und in Wasser verteilt worden sind. Zum Unterschiede von der Verfettung verschwinden die bei der trüben Schwellung innerhalb der Zellen sichtbaren Körner bei Essigsäurezusatz, während sie andererseits durch Fettlösungsmittel: Alkohol absolut., Äther, Chloroform usw. nicht angegriffen werden. Sehr brauchbar sind auch Doppelmesserschnitte.

## D. Degenerationen.

Zur Untersuchung auf fettige Degeneration verwendet man frische Quetsch-, Zupf- oder Schnittpräparate, Gefrierschnitte nach Formolfixierung oder Paraffinschnitte nach Osmiumbehandlung. Man unterwirft das Fett den S. 81 angeführten Reagenzien, den Fettfarbstoffen und der Osmierung. Oft ist Untersuchung im polarisierten Licht auf Doppelbrechung angebracht.

Für schleimige, hyaline, colloide und amyloide Degenerationen ergeben sich die Untersuchungen aus dem bei Darstellung der betreffenden Substanzen Gesagten (Kapitel IX) von selbst.

## E. Untersuchung wuchernder und entzündeter Gewebe.

Zur frischen Untersuchung von Geschwülsten zum Zweck der Diagnose wendet man das Zerzupfungsverfahren an, wenn es sich um Tumoren mit viel Bindegewebe handelt. Bei zellreichen Geschwülsten, namentlich Sarkomen und Karzinomen, kann man durch bloßes Überstreichen mit dem Messer Material gewinnen, um die Form, Größe und Art der Zellen festzustellen.

Zur schnellen Diagnosenstellung kann man Schnitte nach den bei der Formalinfixierung, bei dem Gefrierverfahren und bei der Paraffineinbettung angegebenen Schnellmethoden herstellen und färben.

Wuchernde und entzündete Gewebe werden in Flemming'scher Lösung, in Müller'scher Flüssigkeit, Alkohol oder in Formalin gehärtet.

Vor allem ist die Müller'sche Flüssigkeit anzuwenden, wenn es darauf ankommt, entweder Schrumpfungen der Gewebe möglichst zu vermeiden oder das Blut in den Gefäßen zu erhalten. Zarte, zellreiche Gewebe, weiche Sarkome, myxomatöse Geschwülste, Gliome, Enchondrome usw. färben sich nach Härtung in Müller'scher Flüssigkeit weit schöner als bei Alkoholhärtung. Auch die Zenker'sche Flüssigkeit (s. S. 18) ist empfehlenswert, ebenso die Orth'sche Mischung von Müller'scher Flüssigkeit und Formalin (S. 17).

Will man dagegen wuchernde Gewebe zugleich auf die Gegenwart von Bakterien untersuchen, so ist Härtung in Alkohol vorzuziehen.

Wenn man genauere Untersuchungen über die in wuchernden Geweben, z. B. in Geschwülsten, enthaltenen Zell- und Kernstrukturen anstellen will, so kann man einmal eine möglichst frische Untersuchung der Zellen in indifferenten Lösungen, etwa 0,6-proz. Kochsalzlösung, vornehmen. Von Arnold wird eine ganz schwache Lösung von Methylgrün in 0,6-proz. Kochsalzlösung als sehr geeignet zur Untersuchung von Zellen und von deren Kernen empfohlen. Ganz besonders kommen aber auch hier in Betracht Präparate, die nach den für Darstellung der Kernteilungsfiguren (s. S. 62) empfohlenen Methoden behandelt sind. Am besten eignet sich dazu die Flemming'sche Lösung. Die Untersuchung auf Kernteilungsfiguren ist ferner ganz unerläßlich, wenn man entscheiden will, von welchen Zellarten bei entzündlicher Neubildung, bei Hyperplasieen, bei Tumoren usw. die Wucherung resp. die Gewebsneubildung ausgeht. Bei Tumoren wählt man zu derartigen Untersuchungen Teile, die der Grenze zwischen Geschwulst und präexistierendem Gewebe entnommen sind.

Zur Erkennung der Provenienz der verschiedenen Zellarten eignet sich u. a. auch sehr gut die Triacidfärbung. Auch die Färbung von Romanowsky-Ziemann (s. unter Blut) dürfte oft gute Dienste tun. Die Schnitte sind in erster Linie mit kernfärbenden Mitteln zu behandeln. Dabei ist zu bemerken, daß sich gewöhnlich die verschiedenen Zellarten in verschiedener Intensität färben. Am dunkelsten werden namentlich durch Hämatoxylin die Leukozyten tingiert, so daß man schon in der Farbenreaktion ein wichtiges Hilfsmittel hat, um die ausgewanderten weißen Blutzellen resp. entzündlichen Infiltrate von den präexistierenden Gewebszellen, auch wenn sie im übrigen ähnliche Form besitzen, zu unterscheiden.

Mastzellen und Plasmazellen werden nach den im Kap. XIV unter Blut angegebenen Methoden dargestellt.

Auch zur Darstellung des Bindegewebes und der Interzellularsubstanz der Sarkome genügt im allgemeinen die VAN GIESON'sche Färbung. Für feinere Untersuchungen verwendet man die Kollagenfärbungen nach MALLORY oder UNNA (s. S. 67—69). Auch Elasticafärbungen (s. S. 69) sind oft vorteilhaft.

Fibrin wird nach den S. 74 dargestellten Regeln behandelt.

Degenerative Veränderungen, namentlich schleimige Entartung, z. B. des Knorpels, hyaline Bildungen usw. werden am besten durch die VAN GIESON'sche Methode sichtbar gemacht, die auch die einzelnen Zellarten gut differenziert.

Fett und Glykogen sind häufig in Geschwülsten vorhanden und werden mit den beschriebenen Methoden (S. 80 und S. 85) untersucht.

Der experimentelle **Entzündungsprozeß im lebenden Gewebe** wird gewöhnlich am Mesenterium des Frosches studiert.

Man wählt zur Untersuchung große, männliche Tiere, weil bei Weibchen sich die Sexualorgane bei dem Herausziehen des Mesenteriums oft störend in den Weg legen. Man bläst dem Tiere mit einer Glaspipette 2 Tropfen 1-proz. wässeriger Curarelösung unter die Haut, die man am besten am Oberschenkel mit einer feinen Hohlschere an einer kleinen Stelle spaltet. Nach etwa $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde ist dann das Tier bewegungslos. Nun spaltet man in der Axillarlinie die Bauchwand, und zwar zunächst die Haut, dann die Muskulatur und eröffnet schließlich etwa in der Ausdehnung eines Zentimeters mittels eines von oben nach unten verlaufenden Schnittes die Bauchhöhle. Sowie bei den einzelnen Phasen des Schnittes eine Blutung auftritt, sucht man diese, bevor man weiter nach der Tiefe vordringt, zu stillen, was gewöhnlich durch Aufdrücken von Fließpapier gelingt.

Dann zieht man eine Darmschlinge samt ihrem Mesenterium vor und spannt sie über einen Korkring, den man mit dem Locheisen aus einer Korkplatte ausgeschnitten und mittels Siegellack auf einer Glasplatte befestigt hat. Das Mesenterium wird mit Karlsbader Nadeln fixiert, welche man durch den Darm auf dem Kork festheftet. Natürlich muß die Curarisierung eine vollständige sein, weil sich sonst das Tier loszerrt.

Als Unterlage eignen sich namentlich die Glasplatten, wie sie zu Plattenkulturen im Gebrauch sind. Man befestigt dann den Kork an einer Längsseite, so daß das Tier neben dem Kork auf der Platte ausgiebigen Platz findet. Das Tier wird mit Ausnahme derjenigen Stelle über dem Korkring, welche man unter das Mikroskop bringt, ganz mit Fließpapier bedeckt, welches mit Wasser durchtränkt ist.

Man kann dann meist schon nach $^1/_4$ Stunde den Beginn der Auswanderung der weißen Blutkörperchen beobachten und die Beobachtung Stunden lang fortsetzen, wenn nur das Tier ganz mit feuchtem Fließpapier bedeckt ist. Will man die Untersuchung über einen Tag hinaus ausdehnen, so muß man von neuem curarisieren.

In ähnlicher Weise kann auch die Schwimmhaut und die Zunge des Frosches zur Beobachtung der Zirkulation benutzt werden.

Elftes Kapitel.

# Untersuchung von Bakterien.

## A. Untersuchung der ungefärbten Bakterien auf dem Objektträger.

Man bringt von der zu untersuchenden Flüssigkeit einen Tropfen auf den Objektträger, entweder unverdünnt oder, wenn die Flüssigkeit sehr reich an zelligen Bestandteilen ist, mit etwas destilliertem Wasser verdünnt, und deckt mit einem Deckglas zu.

Man untersucht dann mit starker Vergrößerung und enger Blendung. Man kann sich die Untersuchung erleichtern, und sich, namentlich wenn es sich um Kokken handelt, vor einer Verwechslung mit Eiweißkörnchen schützen, wenn man zu dem Präparat verdünnte Essigsäure oder 2-proz. Kalilauge bringt, gegen welche die Bakterien sich — mit Ausnahme der Rekurrensspirillen — resistent verhalten. Ebenso werden Bakterien durch Alkohol, Chloroform und Äther nicht verändert, während Fetttröpfchen verschwinden.

In den meisten Fällen sichert übrigens schon die ganz gleichmäßige Form und Größe der Bakterien, oft auch ihre eigentümliche Lagerung in Ketten-, Trauben- oder Zoogloeaform vor Irrtümern.

Will man Bakterien aus einer Kultur frisch untersuchen, so bringt man mit einer ausgeglühten Platinöse etwas von der Kultur in einem Tropfen Wasser auf den Objektträger und verreibt es auf diesem. Statt des destillierten Wassers kann man auch 0,6-proz. Kochsalzlösung oder Bouillon verwenden. Die Eigenbewegung der Bakterien sistiert man, wenn sie für die Untersuchung störend wird, dadurch, daß man vom Rande des Deckgläschens aus einen Tropfen Sublimatlösung zufließen läßt.

Für bewegliche Mikroorganismen eignet sich Untersuchung mit Dunkelfeldbeleuchtung (S. 5), man kann damit auch die kleinsten, eventuell ultramikroskopische erkennen.

## B. Die Untersuchung im hängenden Tropfen.

Dieselbe ist viel bedeutsamer, weil sie auch die Lebensbedingungen der Bakterien fortgesetzt zu beobachten gestattet.

Man bedient sich dazu der hohlgeschliffenen Objektträger, welche in der Mitte eine uhrschalenförmige Vertiefung besitzen. Diese Vertiefung wird rings an ihrem Rande mit einer ganz dünnen Schicht Vaseline bestrichen, damit die kleine feuchte Kammer, welche gebildet wird, wenn man auf diese Vertiefung das Deckglas auflegt, luftdicht abgeschlossen werden kann. Nun bringt man auf die Mitte des vorher sorgfältig gereinigten Deckglases vermittelst der Platinöse einen feinen Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit und legt dann das Deckglas so auf die Vaselinschicht, daß der Tropfen nach unten in den Hohlraum des Objektträgers frei herunterhängt. Objektträger und Deckglas,

sowie alle sonstigen zur Verwendung kommenden Instrumente müssen durch Ausglühen gut sterilisiert sein.

Auch im hängenden Tropfen untersucht man mit enger Blendung. Vor allem muß man sich hüten, bei der nicht ganz leichten groben Einstellung des Tubus das Deckgläschen einzudrücken. Der Rand des Tropfens ist für Ungeübte leichter einzustellen. Hier sammeln sich außerdem bewegliche Bakterien mit Vorliebe in größerer Zahl an. Hat man die Untersuchung im hängenden Tropfen beendigt, so kann man das Deckglas abheben, etwa anhaftende Vaseline mit Benzin entfernen und dann, nachdem der ausgestrichene Tropfen angetrocknet ist, noch nachträglich färben.

Will man die biologischen Eigenschaften bestimmter Bakterien, die man z. B. in einer Reinkultur gezüchtet hat, studieren, so bringt man auf das Deckgläschen einen Tropfen sterilisierter Bouillon und impft dann den Bouillontropfen mittels einer ausgeglühten Platinnadel von der betreffenden Reinkultur. In dieser Weise kann man die Untersuchung im hängenden Tropfen Tage lang fortsetzen und auch zwischendurch das Präparat im Brütofen verweilen lassen.

Die Untersuchung auf Agglutination bei der WIDAL'schen Reaktion kann ebenfalls im hängenden Tropfen ausgeführt werden.

## C. Vitale Bakterienfärbung.

Bakterien lassen sich auch im lebenden Zustande färben; die Eigenbewegung bleibt dabei erhalten. NAKANISHI präpariert sich gut gereinigte Objektträger in der Weise, daß er sie mit einer gesättigten wässerigen Methylenblaulösung (B. B. Höchst) bestreicht, und diese wieder abwischt, bis das Glas eben himmelblaue Färbung behalten hat. Oder man übergießt den Objektträger mit siedend heißer Methylenblaulösung und wischt ihn ebenfalls ab. Dann beschickt man Deckgläschen mit dem zu untersuchenden Material und legt sie naß auf den vorbehandelten getrockneten Objektträger.

Bei gonorrhoischem Eiter verfährt PLATO so, daß er ihn mit verdünnter Neutralrotlösung (1 ccm konzentrierter wässeriger Lösung + 100 ccm 0,8-proz. Kochsalzlösung) vermischt und ein Deckglas auflegt. Die intracellulären Kokken färben sich intensiv, die extracellulären wenig oder gar nicht.

Man kann auch dem bakterienhaltigen hängenden Tropfen etwas Neutralrot oder rektifiziertes Methylenblau zusetzen.

Eine sehr bequeme Methode ist die vitale Färbung nach MANDELBAUM zur Auffindung der Spirochaete pallida. Man setzt dem hängenden Tropfen mit der Platinnadel etwas LÖFFLER's Methylenblau (S. 101) hinzu, vermengt beide gut und fügt nun eine Öse $^1/_{10}$ Normalnatronlaugenlösung hinzu.

## D. Untersuchung von Deckglastrockenpräparaten.

Will man eine Flüssigkeit mittels des Färbeverfahrens auf Bakterien untersuchen, so streicht man eine dünne Lage derselben auf dem Deckgläschen mittels der Platinöse aus, oder man bedeckt das mit einem Tropfen der Flüssigkeit versehene Deckglas mit einem zweiten und zieht

dann beide voneinander ab. Dann läßt man das Deckglas, mit der bestrichenen Seite nach oben, lufttrocken werden und zieht es dreimal langsam durch eine Spiritusflamme. Es ist aber zu bemerken, daß man diese Fixation durch das Erwärmen nicht eher vornehmen darf, als bis das Präparat vollkommen lufttrocken geworden ist. Nun bringt man das Deckgläschen entweder so in ein Uhrschälchen mit Farblösung, daß man das zwischen Daumen und Zeigefinger gefaßte Gläschen auf die Farbflüssigkeit herabfallen läßt, auf welcher es dann mit der bestrichenen Seite nach unten schwimmt, oder man trägt vermittelst eines Glasstabes oder einer Pipette einfach ein paar Tropfen der Farblösung auf das Deckglas auf, das man am besten in einer Cornet'schen Pinzette fixiert hat. Nach 1—2—3 Minuten wäscht man in Wasser ab, indem man das Deckglas in einer Schale mit Wasser hin- und herbewegt, bis es keine Farbe mehr abgibt, oder indem man auf die gefärbte Seite den Strahl einer Spritzflasche wirken läßt; dann trocknet man das Deckglas sehr sorgfältig zwischen mehrmals gewechselten Lagen von Fließpapier ab; man kann auch das vollständige Trockenwerden des Präparats noch dadurch sichern, daß man dasselbe mehrmals über der Flamme hin- und herzieht. Wenn das Präparat noch irgend Spuren von Feuchtigkeit enthält, so wird der Kanadabalsam trübe.

Dann bringt man das Deckglas mit einem Tropfen Kanadabalsam auf den Objektträger. Will man das Präparat nicht konservieren, so kann man auch das Deckglas einfach mit einem Tropfen Wasser auf den Objektträger bringen. Die Kanadabalsampräparate geben aber viel bessere Bilder.

Will man eine isolierte Färbung der Bakterien, ohne Färbung der Kerne usw., erzielen, so bringt man das Deckgläschen aus der Farbe zunächst eine Minute lang in eine gesättigte Lösung von kohlensaurem Kali, die zur Hälfte mit Wasser verdünnt ist. Dann erst folgt Auswaschen in Wasser usw.

Die Fixierung kann statt in der Flamme auch so erfolgen, daß man die Präparate für 5—10 Minuten in Alkohol absolutus oder Aether-Alkohol bringt.

Es ist demnach die Reihenfolge der Manipulationen bei der Deckglasfärbung die folgende:

1) Ausbreiten der Flüssigkeit auf dem Deckglas und Trockenwerdenlassen.
2) Dreimaliges Durchziehen durch die Flamme.
3) Färben, 1—3 Minuten lang.
4) Abspülen in Wasser.
5) Trocknen zwischen Fließpapier.
6) Kanadabalsam (säurefrei!).

Für die **Färbung** der Bakterien kommen fast ausschließlich die basischen Anilinfarben in Betracht, und zwar sind am meisten in Gebrauch: Gentianaviolett, Methylenblau, Methylviolett, Thionin, Fuchsin und Bismarckbraun (Vesuvin). Diese Farben kommen meistens in wässeriger Lösung zur Anwendung. Da aber diese wässerigen Lösungen nicht sehr haltbar sind, so hält man sich von den genannten Farbstoffen am besten konzentrierte alkoholische Lösungen vorrätig, von denen man sich dann vor dem jedesmaligen Gebrauch durch Einträufeln in

destilliertes Wasser eine frische wässerige Lösung bereitet, die einen Farbstoffgehalt von etwa $1-1^1/_2$ Proz. haben soll.

## Verstärkung der Färbekraft

der Anilinfarben kann erreicht werden

a) Durch Erwärmung, entweder längere Zeit bei Brütofentemperatur oder für kurze Zeit über einer Spirituslampe, bis von der Oberfläche der Flüssigkeitsschicht Dämpfe aufzusteigen beginnen.

b) Durch einen Zusatz von Kalilauge. Dieser bediente sich Koch, zusammen mit dem Einfluß der Wärme bei der ursprünglichen Tuberkelbazillenfärbung.

Jetzt kommt die Kalilauge vorwiegend noch in der **Löffler'schen Methylenblaulösung** zur Verwendung, welche wegen ihrer vielfachen Gebrauchsfähigkeit und ihrer Haltbarkeit eine Art von Universalfärbemittel für Bakterien darstellt. Ihre Zusammensetzung ist:

| | |
|---|---|
| Konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung | 30 ccm |
| Kalilauge 0,01 : 100 | 100 „ |

c) Durch Lösen der Farbe in Anilinwasser. Am häufigsten verwendet man **Anilinwassergentianaviolett** und **Anilinwasserfuchsin.**

Herstellung des Anilinwassergentianavioletts:

Man schüttelt 10 ccm Anilinöl in 100 ccm Wasser ordentlich um und filtriert die milchige Flüssigkeit durch ein angefeuchtetes Filter, sie muß dann klar und vollkommen durchsichtig abfließen; hat man das Filter nicht gut angefeuchtet, so schlüpfen Anilinöltröpfchen mit hindurch. Zu dem Filtrate setzt man konzentrierte alkoholische Gentianaviolettlösung hinzu (etwa 11 ccm). Vor dem Gebrauche muß die Lösung filtriert werden. Auch ist sie meist nur wenige Wochen haltbar.

d) Ebenso wie Anilinwasser verstärkt auch 5-proz. Karbolwasser die Wirkung der Anilinfarben. Die Karbolwasserlösungen der Anilinfarben sind ganz besonders zu empfehlen wegen ihrer ausgezeichneten Färbefähigkeit und ihrer Haltbarkeit.

Am häufigsten verwendet wird das **Karbolfuchsin**, das auch in 5—10facher Verdünnung noch gut färbt.

| | |
|---|---|
| Fuchsin | 1,0 |
| Alkohol | 10,0 |
| 5-proz. Karbolwasser | 100,0. |

Gute Resultate bei der Färbung der meisten Bakterien, namentlich auch solcher, die sich leicht entfärben, erzielt man durch die **Thioninmethode von Nicolle.**

1) Färben $^1/_2-1$ Minuten lang in einer Mischung von

| | |
|---|---|
| Thionin, gesättigte Lösung in 50-proz. Alkohol | 10,0 |
| 1-proz. Karbolwasser | 100,0 |

2) Abspülen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Zur Doppelfärbung empfehlen Pick und Jacobson 4—10 Sekunden langes Färben in einem Farbengemisch von: Karbolfuchsin 15 Tropfen, konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung 8 Tropfen, Aqu. dest. 20 ccm. Bakterien dunkelblau, Kerne hellblau, Protoplasma und Schleim rot. Nimmt man nach C. Fraenkel 45 Tropfen Karbolfuchsin

und färbt 5 Minuten, so erscheinen auch die Kerne rot und nur die Bakterien dunkelblau. Man kann eine ähnliche Doppelfärbung auch dadurch erzielen, daß man zuerst in Karbolfuchsin und dann in Methylenblau färbt.

## Die Differenzierung

und Entfernung der überschüssigen Farbe geschieht bei weitem in den meisten Fällen durch einfaches Auswaschen in reichlichen Mengen von destilliertem Wasser.

Außerdem kommen in Betracht:

a) Alkohol,

b) verdünnte Essigsäure, meist $^1/_2$—1-proz.

Beide bewirken eine vollständigere Entfernung der Farbe und bei Schnitten ein besseres Hervortreten der Kernfärbung. Zu letzterem Zweck wendet man auch manchmal zuerst Essigsäure und dann noch Alkohol an.

c) Jodjodkalilösung 1 : 2 : 100.

d) Mineralsäuren 3—10-proz.

Diese beiden letzteren Mittel entfärben sehr stark, auch einen Teil der Spaltspitze, so daß dadurch andere Bakterienarten, welche die Fähigkeit haben, die Farbe länger festzuhalten, besser hervortreten.

e) Verschiedene Salze, welche die Kerne entfärben: kohlensaures Kali und Natron, Liquor ferri sesquichlorat., Kali bichrom., Kalium hypermanganic., Palladiumchlorid, kohlensaures Lithion usw.

f) Auch durch saure Anilinfarben: Tropaeolin und Fluorescin, die man dem zur Entfärbung verwendeten Alkohol zusetzt, wird eine stärkere Entfärbung bewirkt als durch Alkohol allein.

g) Anilinöl, wie es in der Fibrin- und Bakterienfärbung von Weigert zur Anwendung kommt. Die entfärbende Kraft kann vermindert oder abgestumpft werden durch Zusatz von Xylol in verschiedenem Mengenverhältnis. Gesteigert kann die entfärbende Fähigkeit werden durch Zusatz von Säuren, z. B. Salzsäure 1 : 1000, Pikrinsäure 1 : 10000 oder Salze, z. B. Chlornatrium im Überschuß.

### Das Gram'sche Färbungsverfahren für Trockenpräparate.

1) Färbung 2—5 Minuten lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung (s. S. 101) oder besser gesättigte Gentianaviolettlösung in $2^1/_2$-proz. Karbolwasser.
2) Übertragen des Präparats 1—$1^1/_2$ Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300, in welcher dasselbe ganz schwarz wird.
3) Entfärben in Alkohol, bis die anfangs schwarze Farbe verschwunden und das Präparat blaßgrau geworden ist.
4) Einlegen in Kanadabalsam.

Die Entfärbung in absolutem Alkohol kann nach Günther beschleunigt und verstärkt werden, wenn man demselben 3 Teile Salpetersäure zusetzt. Dieses Verfahren hat außer der schnelleren und gründlicheren Entfärbung auch den Vorteil, daß dabei Niederschläge von Farbstoff mehr vermieden werden. Die Präparate kommen dann aus der Jodjodkalilösung zunächst in reinen absoluten Alkohol, dann für 10 Sekunden in Salpetersäurealkohol, und dann wieder in reinen Alkohol.

Nach Ribbert kann man auch zur schnelleren und stärkeren Entfärbung dem Alkohol 10—20 Teile Essigsäure zusetzen. Nicolle empfiehlt als ein sicheres Entfärbungsmittel Alkohol, dem $^1/_3$—$^1/_6$ Volumen Aceton zugesetzt ist.

Claudius wendet statt der Jodjodkalilösung konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt ist, an. In dieser bleiben Deckglastrockenpräparate 1 Minute, Schnitte, nachdem sie mit Wasser abgespült sind, 2 Minuten. Entfärbt wird nach der Vorschrift von Claudius in Chloroform, man kann aber auch Alkohol, oder wie bei der Weigert'schen Methode, Anilinölxylol nehmen. Nach dieser Vorschrift färben sich auch die Bazillen des Rauschbrandes und des malignen Oedems (s. unten).

Auch durch Anwendung von Methylviolett statt des Gentianavioletts der ursprünglichen Vorschrift werden Niederschläge eher vermieden und die Bakterien erhalten einen leuchtend blauen Farbenton. Löffler hat von den vielen Marken des Handels Methylviolett 6B und Methylviolett BN als die zuverlässigsten erprobt (s. S. 111). Die Gram'sche Färbungsmethode hat zwei große Vorteile. Einmal wird alles, was in den Präparaten noch an zelligen Bestandteilen vorhanden ist, entfärbt, so daß die Bakterien mit tiefblauer Farbe um so deutlicher und schärfer hervortreten. Eine Ausnahme machen nur die Kernteilungsfiguren, die Mastzellenkörner, die Hornschicht der Epidermis und die serösen Überzüge der Organe. Die Zellen können übrigens durch eine nachträgliche Kontrastfärbung mit Bismarckbraun wieder sichtbar gemacht werden. Eine Grundierung der Präparate erreicht man dadurch, daß man dem zum Entfärben benutzten Alkohol etwas Eosin zusetzt.

Die nach der Gram'schen Methode entfärbten Bazillen kann man durch eine Kontrastfärbung mit Fuchsin wieder sichtbar machen. Nicolle empfiehlt hierzu konzentrierte alkoholische Lösung 5 ccm auf 100 ccm Wasser. Die Nachfärbung kann nach Czaplewski auch mit Karbolfuchsinglyzerinlösung erfolgen. 1 g Fuchsin wird mit 5 ccm Acid. carbolic. liquefactum bis zur völligen Lösung der Kristalle in einer Reibschale verrieben; zu dieser Lösung werden unter ständigem Verreiben 50 ccm Glyzerin zugesetzt und nach erfolgter Mischung mit 100 ccm Wasser verdünnt. Beim Gebrauch verdünnt man diese Stammlösung mit 10 Teilen Wasser, färbt damit unter leichtem Erwärmen und spült mit Wasser ab.

Der zweite große Vorzug des Gram'schen Verfahrens besteht darin, daß durch dasselbe nur gewisse Bakterienarten gefärbt bleiben, während andere, die sonst manchmal den gefärbt bleibenden morphologisch sehr ähnlich sind, entfärbt werden. Es kann also unter Umständen das Gram'sche Verfahren zu differentiell-diagnostischen Zwecken verwandt werden und kommt dann eventuell noch neben der gewöhnlichen Bakterienfärbung zur Anwendung. In diesen Fällen ist Abspülen in Wasser zu vermeiden.

Hierbei ist aber zu beachten, daß sich manche Bakterienarten in jugendlichem Zustande nach Gram färben, später aber schlecht oder gar nicht mehr.

Nach Gram färben sich: Tuberkelbacillus, Leprabacillus, Tetanusbacillus, Pneumoniecoccus von Fraenkel-Weichselbaum, Streptococcus

pyogenes, Streptococcus des Erysipels, Staphylococcus pyogenes aureus, albus, citreus und flavus, Milzbrandbazillen, Bazillen des Schweinerotlaufs, der Mäuseseptikämie, Diphteriebacillus, Mikrococcus tetragenus, Aktinomycesfäden, Bazillen des Rhinoskleroms und Soorpilz.

Nach Gram werden entfärbt: Typhusbazillen, Gonokokken, Friedländer'sche Kapselbazillen, Koch'scher Kommabacillus der Cholera, Rotzbacillus, Bacillus des malignen Oedems, Rauschbrandbacillus (s. oben, Methode von Claudius), Hühnercholera, Kaninchenseptikämie, Schweineseuche, Rinder- und Wildseuche, Rekurrensspirillen, Bacterium coli, Pestbacillus, Influenzabacillus, Bacillus pyocyaneus.

Über die Strukturverhältnisse der Bakterien gibt näheren Aufschluß die Romanowsky-Ziemann'sche Färbung (s. Kap. XIV. Blut). Mit dieser kann man in den Bakterien eine Differenzierung in eine rot bis rotbraun gefärbte zentrale und in eine blasse periphere Partie sichtbar machen. Noch mehr leisten die zahlreichen Modifikationen der Romanowsky'schen Methode, besonders die Giemsafärbung.

## E. Darstellung der Geißeln und Wimperhaare der Bakterien.

Die Geißelfärbung gehört zu den schwierigsten Objekten der Färbetechnik und gelingt nur bei peinlicher Einhaltung gewisser Vorsichtsmaßregeln.

1) Es dürfen nur völlig gereinigte Deckgläschen benutzt werden. Zur Reinigung empfiehlt Heymann, die Deckgläschen in konzentrierter Schwefelsäure $^1/_2$ Stunde zu kochen; hierauf läßt man die Säure langsam abkühlen, gießt sie ab und spült vorsichtig nacheinander je dreimal mit destilliertem Wasser, mit absolutem Alkohol, mit Ammoniakalkohol, mit 60-proz., 96-proz. Alkohol und schließlich mit Äther ab. Die Deckgläschen dürfen nur mit Pinzetten angefaßt werden und werden noch 2 Stunden im Trockenschrank erhitzt.

2) Die Kultur muß jung, 12—18 Stunden alt sein und lebhafte Eigenbewegung zeigen, wovon man sich erst im hängenden Tropfen überzeugen soll. Am besten sind Agaroberflächenkulturen, von denen man eine Spur möglichst ohne jeden Nährboden entnimmt.

3) Die Bakterien müssen sehr fein verteilt werden. Man erreicht dies am besten, indem man zwei Deckgläschen mit einem Tropfen Leitungswasser bedeckt, in den ersten von der Kultur impft und eine Platinöse voll auf den zweiten Tropfen überträgt. Eine Platinöse dieses zweiten Tropfens verteilt man nun auf einem dritten Deckgläschen und läßt dieses lufttrocken werden.

4) Das völlig lufttrockene Präparat muß sehr vorsichtig in gelinder Wärme fixiert werden. Nach Heymann zieht man das Deckgläschen besser nicht durch die Flamme, sondern fixiert mittels eines durch mehrmaliges Durchziehen durch die Flamme erhitzten Objektträgers, den man 1—2 Minuten in einer Entfernung von etwa 2—3 cm über das Deckglas hält.

Nun ist das Präparat zur Weiterbehandlung fertig.

**Löffler's Geißelmethode.** Sie beruht auf der Anwendung einer Beize, welche in folgender Weise hergestellt wird:

1) Zu 10 ccm einer wässerigen Tanninlösung (20 : 80) werden so viel Tropfen kaltgesättigter, wässeriger Ferrosulfatlösung zugesetzt, bis die Flüssigkeit schwarz-violett erscheint; dann wird 1 ccm wässerige oder alkoholische Lösung von Fuchsin zugesetzt (weniger wirksam wie Fuchsin sind Methylviolett, oder Kampecheholzdekokt = 1 : 8). Mit dieser Beize wird das Deckglastrockenpräparat unter vorsichtigem Erwärmen über der Flamme behandelt, bis Dampfentwicklung eintritt, dann wird das Deckglas noch 1 oder $1^1/_2$ Minuten mit der Beize in Kontakt gelassen.

Für manche Bakterien (Säurebildner) wird besser ein Zusatz von Alkali (einige Tropfen einer 1-proz. NaOH-Lösung), für andere (Alkalibildner) besser ein Säurezusatz ($H_2SO_4$). Der Grad des Säure- oder Alkalizusatzes muß dann ausprobiert werden.

2) Abspülen in Wasser, dann in absolutem Alkohol.

3) Nachfärben in einer gesättigten Anilinwasser-Fuchsinlösung, welche durch tropfenweisen Zusatz einer 1-proz. NaOH-Lösung neutralisiert ist. Es wird so lange NaOH-Lösung zugesetzt, bis die an und für sich in einer mehrere Zentimenter dicken Schicht noch durchsichtige Flüssigkeit anfängt, undurchsichtig zu werden. Diese Farbflüssigkeit wird auf das Deckglas aufgetropft und letzteres etwa 1 Minute lang erwärmt, bis Dampfbildung auftritt.

**Modifikationen.** Bunge empfiehlt folgende Beize: 25 Teile einer 20fach verdünnten Eisenchloridlösung werden mit 75 Teilen einer gesättigten wässerigen Tanninlösung versetzt. Dieser Mischung wird direkt vor dem Gebrauch soviel einer 3-proz. Wasserstoffsuperoxydlösung zugesetzt, bis sie völlig braun wird. Nach dem Filtrieren ist diese Beize sogleich brauchbar. Einwirkung 1 Minute unter gelindem Erwärmen; Färbung in leicht erwärmtem Karbolfuchsin oder Karbolgentianaviolett.

Die Beize von Fischer, die der Autor als für alle Bakterienarten geeignet bezeichnet, hat folgende Zusammensetzung: 2 g trockenes, eventuell unter dem Exsikkator aufbewahrtes Tannin werden unter schnellem Erwärmen in 20 ccm Wasser gelöst, dann 4 ccm Eisensulfatlösung (1 : 2) zugesetzt und 1 ccm konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung zugegeben. Dann wird ohne zu kochen filtriert. Hierbei muß ein dickbreiiger Filterrückstand übrig bleiben. Die Eisenvitriollösung muß grün aussehen. Ist sie durch Oxydation gelblich oder bräunlich geworden, so setzt man einige Tropfen $H_2SO_4$ zu.

In dieser Beize werden die Deckgläschen vorsichtig $^1/_2$ Minute erhitzt, bis Dampf aufzusteigen beginnt, dann noch $^1/_2$ Minute mit derselben in Kontakt gelassen; dann Abspritzen der Beize mit der Spritzflasche, Färben in erwärmter, konzentrierter, wässeriger Fuchsinlösung.

### van Ermengem's Geißelmethode.

1) Übertragen des Deckglaspräparates $^1/_2$ Stunde in der Kälte oder 5 Minuten bei 50° in

| | |
|---|---|
| 2-proz. Osmiumsäure | 1 Teil, |
| 10—25-proz. Tanninlösung | 2 Teile, |
| Eisessig auf 100 ccm | 5 Tropfen. |

2) Sorgfältiges Abspülen in Wasser.
3) Sorgfältiges Abspülen in absolutem Alkohol.

4) Eintauchen für einige Sekunden in 0,25-proz. bis 0,5-proz. Silbernitratlösung.
5) Übertragen, ohne Abspülen in eine Lösung von Acid. gallic. 5,0, Tannin 3,0, Natr. acetic. fus. 10,0, Aqua destill. 350,0.
6) Nach wenigen Sekunden Zurückverbringen unter fortwährender Bewegung in die Lösung sub 4, bis diese sich zu schwärzen beginnt.
7) Abspülen mit reichlichem Wasser, Trocknen mit Fließpapier, Balsam.

**HINTERBERGER's Modifikation.**

1) Beizung 30 Minuten in VAN ERMENGEM's Beize.
2) Abspülen in Wasser, Alkohol, nochmals Wasser.
3) Aufträufeln von 1-proz. Höllensteinlösung.
4) Mehrmaliges Eintauchen in 0,7-proz. Kochsalzlösung und 30-proz. Ammoniak.
5) Entfernung des überschüssigen Ammoniaks und des gelösten Chlorsilbers in 95-proz. Alkohol.
6) Aufträufeln von Galluslösung (3-proz. Gallussäure 20,0, 50-proz. essigsaures Natron 2,0, Aqua dest. 20,0).
7) Baden des Präparats in 0,25-proz. Silbernitratlösung, bis dieselbe trüb zu werden beginnt und die Bakterienmasse braun wird.
8) Abspülen mit Wasser.

**ZETTNOW's Geißelmethode.**

1) Warm beizen in folgender Beize
Einer 5-proz. Tanninlösung wird Tartar. stibiat. (2 : 30) zugesetzt, so lange der entstehende Niederschlag konstant bleibt (etwa 15 ccm Brechweinsteinlösung auf 100 Tanninlösung).
2) Abspülen.
3) Versilbern in Argentum nitr. 5,0, Aqua dest. 30,0, Natr. sulf. 6,0. Der Niederschlag wird gewaschen, mit 500 ccm Aqua dest. vermischt und absitzen lassen. Von der überstehenden Flüssigkeit werden gleiche Teile mit Wasser gemischt und hierzu so viel Äthylamin und Ammoniak zugesetzt, bis der braune Niederschlag wieder verschwunden ist.
4) Abspülen.

**Geißelfärbung nach LUCA VALENTI.**

Auf das Präparat werden 2—3 Tropfen einer 20-proz. Gerbsäure gebracht, abgespült. Dann wird unter Erwärmen Karbolfuchsinlösung zugesetzt, abgespült und getrocknet.

## F. Sporenfärbung.

Die Sporen bilden helle, stark glänzende Körner entweder innerhalb der Bazillen oder an einem Ende des Stäbchens. Sie sind dadurch ausgezeichnet, daß sie den Farbstoff viel schwerer aufnehmen als Bakterien und demgemäß bei den gewöhnlichen Bakterienfärbungen als ungefärbte, helle Körnchen erscheinen. Sie geben aber auch den einmal aufgenommen Farbstoff viel schwerer wieder ab, als die Bakterien selbst. Darauf beruht die Methode der Sporenfärbung.

Man färbt dieselben längere Zeit in der Wärme mit Anilinwasserfuchsin oder Karbolfuchsin und entfärbt dann kurze Zeit in einer Mineralsäure, die den Bakterienleib wieder entfärbt, während die Spore gefärbt bleibt. Wäscht man dann in Wasser aus und wendet nachträglich für die schon entfärbten Bakterien eine Kontrastfärbung, am besten Methylenblau, an, so erscheinen die Sporen, die von der nachträglichen Methylenblaufärbung unbeeinflußt bleiben, rot, die Bakterien dagegen blau. Die Färbung der Sporen ist mit Sicherheit bis jetzt nur in Deckglaspräparaten gelungen.

Das Verfahren stellt sich also folgendermaßen dar:

1) Aufstreichen der zu untersuchenden Flüssigkeit auf Deckgläser, Lufttrocknen und dreimaliges Durchziehen durch die Flamme.
2) Färbung 20—40 Minuten lang in erwärmter Anilinwasserfuchsinlösung oder in Karbolfuchsin.
3) 1 Minute lang Entfärben in 5-proz. Salpetersäure oder 25-proz. Schwefelsäure.
4) Abspülen in Wasser.
5) Färben, 2 Minuten lang in Löffler'schem Methylenblau.
6) Abspülen in Wasser.
7) Trocknen zwischen Fließpapier.
8) Kanadabalsam.

Sporenfärbung von Möller.

1) Fixieren des lufttrockenen Deckglaspräparates durch dreimaliges Durchziehen durch die Flamme oder 2 Minuten langes Eintauchen in absoluten Alkohol.
2) Eintauchen in Chloroform, 2 Minuten lang.
3) Abspülen mit Wasser.
4) Eintauchen in 5-proz. Chromsäurelösung, $^1/_2$—2 Minuten lang.
5) Gründliches Abspülen in Wasser.
6) Auftropfen von Karbolfuchsin, Erwärmen über der Flamme, unter einmaligem Aufkochen, 1 Minute lang.
7) Abgießen des Karbolfuchsin, Entfärbung in 5-proz. Schwefelsäure.
8) Gründliches Auswaschen in Wasser.
9) Färbung, 30 Sekunden lang in wässeriger Lösung von Methylenblau oder Malachitgrün.
10) Abspülen, Trocknen, Kanadabalsam.

Auch die Methode von Löffler zur Darstellung von Geißelfäden der Bakterien ist geeignet zur Sporenfärbung.

Eine isolierte Färbung der Sporen kann man auch erzielen, wenn man die Deckglaspräparate durch öfteres Durchziehen durch die Flamme (10—30 mal) oder durch Einbringen in den Sterilisationschrank bei 200° erhitzt und dann in einer wässerigen Lösung, am besten Methylenblau, färbt. Die Kerne und Bakterien verlieren durch das Erhitzen ihre Färbbarkeit, während umgekehrt die Sporen leichter färbbar werden.

Klein empfiehlt zur Färbung der Sporen folgendes Verfahren: Von dem sporenhaltigen Material wird eine Emulsion in 0,6-proz. Kochsalzlösung hergestellt, mit dem gleichen Quantum filtrierter Karbolfuchsinlösung versetzt und 6 Minuten lang schwach erwärmt. Dann wird die Masse ausgestrichen, an der Luft getrocknet und durch zweimaliges

Durchziehen durch die Flamme fixiert. Darauf Entfärbung 1—2 Sekunden lang in 1-proz. Schwefelsäure. Abspülen in Wasser, Nachfärben in verdünnter wässerig-alkoholischer Methylenblaulösung, Abspülen, Trocknen, Balsameinschluß.

Nach Országh kann man die Sporenmembran für Farbstoffe besser durchgängig machen, wenn man die Bakterienemulsion in gut vermischter Lösung von 4 Teilen $^1/_2$-proz. Natrium salicylicum und 1 Teil 5-proz. Essigsäure herstellt.

## G. Darstellung der Gallerthüllen und Bakterienkapseln.

Die Kapseln lassen sich meist nur an Bakterien darstellen, die frisch dem Tierkörper entstammen. Bei Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden geht die Kapselbildung meist verloren. Am deutlichsten sind die Kapseln häufig bei Betrachtung der gefärbten Präparate in Wasser zu sehen, während die Sichtbarkeit durch Kanadabalsam oft leidet.

### Johne's Kapselfärbung.

1) Erwärmen mit 2-proz. wässeriger Gentianaviolettlösung bis zur Dampfentwicklung.
2) Abspülen in Wasser.
3) Eintauchen in 2-proz. Essigsäure 10 Sekunden.
4) Auswaschen und Untersuchen in Wasser. Bakterien dunkelblau. Kapsel hellblau.

Nach **Friedlaender:**

1) Die dreimal durch die Flamme gezogenen Präparate werden einige Minuten lang in Essigsäure gelegt.
2) Entfernen der Essigsäure durch Blasen mit einem Glasrohr und schnelles Trocknen an der Luft.
3) Färben einige Sekunden lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
4) Abspülen in Wasser; Trocknen zwischen Fließpapier; Kanadabalsam.

Nach **Ribbert:**

1) Färben wenige Minuten lang in einer in der Wärme gesättigten Lösung von:

| | |
|---|---|
| Dahlia in Wasser | 100,0 |
| Alkohol | 50,0 |
| Eisessig | 12,5 |

2) Abspülen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Die Bakterien erscheinen tiefblau, die Kapsel hellblau. Wenn aber die Farblösung zu lange einwirkt, so erscheint auch die Kapsel tiefblau und läßt sich dann nicht mehr von den Kokken unterscheiden.

Nach **Nicolle:** 4—6 Sekunden langes Färben in Karbolgentiana und schnelles Übertragen in Alkohol, dem $^1/_3$ Aceton zugesetzt ist.

Nach **Muir** (für Pneumokokken angegeben).

1) Die Präparate kommen für 2 Minuten in

20-proz. Tanninlösung 2 ccm
Gesättigte wässerige Quecksilberchloridlösung 2 ccm
Gesättigte wässerige Kalialaunlösung 1 ccm

2) Auswaschen in Wasser, dann in Alkohol und wieder in Wasser.
3) Färben in Karbolfuchsin 2 Minuten unter Erwärmen bis zur Dampfbildung.
4) Auswaschen in Wasser; nochmals 2 Minuten mit Lösung 1 behandeln und wieder waschen.
5) Färben 2 Minuten in gesättigt wässeriger Methylenblaulösung.
6) Auswaschen in Wasser. Differenzieren und Entwässern in Alkohol. Balsam.

Bakterien rot, Kapseln blau.

**FRIEDLAENDER's Kapselfärbung für Schnittpräparate.**

1) Färben 2—24 Stunden lang in der Wärme in:
konz. alkoholischer Gentianaviolettlösung 50,0
Aqua destillata 100,0
Eisessig 10,0
2) Auswaschen in 1-proz. Essigsäure. 1—2 Minuten.
3) Alkohol.
4) Kanadabalsam.

Auf diese Weise färbt sich die Kapsel blaßblau, die zentrale Partie dagegen tiefblau. Wenn man den Grad der Entfärbung nicht richtig trifft, so bleibt auch die Kapsel dunkelblau gefärbt.

## H. Bakterienfärbung in Schnittpräparaten.

Die Untersuchung von Bakterien in Schnitten geschieht fast immer nach vorausgegangener Färbung. Härtung in absolutem Alkohol, Formalin oder Sublimat.

Gefrierschnitte von Formolpräparaten sind am besten mit Alkohol nachzubehandeln. Paraffineinbettung ist vorzuziehen, weil Celloidin sich meist intensiv mitfärbt. Zur Färbung werden die Schnitte direkt aus dem Alkohol in die Farblösung gebracht.

Im allgemeinen kommen dieselben Methoden der Färbung in Betracht, wie für die Deckglastrockenpräparate. Dabei sind jedoch gewisse Modifikationen von Vorteil.

1) Meist ist es zweckmäßig, die Schnitte länger in der Farbe zu belassen, als Trockenpräparate derselben Bakterien.

2) Sehr oft ist es von Nutzen, die Färbung in der Wärme vorzunehmen, entweder im Brütofen oder über einer Spiritusflamme. Die Erwärmung über der Spiritusflamme darf nur so weit getrieben werden, bis von der Oberfläche der Farblösung Dämpfe aufzusteigen beginnen.

3) Es erleichtert bei solchen Schnitten, bei denen durch den Entfärbungsprozeß die Kerne entfärbt oder undeutlich werden, die Untersuchung oft sehr, wenn man durch eine Doppelfärbung die Kerne wieder sichtbar macht. Für solche Doppelfärbungen eignen sich namentlich Lithionkarmin, Pikrokarmin und Bismarckbraun.

4) Will man die teilweise Entfärbung der Schnitte, welche das Entwässern in Alkohol mit sich bringt, vermeiden oder verringern, so

kann man dem zum Entwässern benutzten Alkohol etwas von derselben Farbe zusetzen, in der man gefärbt hat. Der Alkohol wirkt dann nur noch wasserentziehend, entzieht aber dem Präparate keine Farbe mehr. In der Regel aber ist dies Verfahren überflüssig, wenn man von vornherein so stark färbt, daß eine partielle Entfärbung in Alkohol nicht nur nicht schadet, sondern erwünscht ist.

5) Zur Aufhellung der Schnitte eignet sich Nelkenöl nicht, da es die Anilinfarben auszieht, zum Teil ihnen auch einen schmutzigen Farbenton verleiht. Besser ist Origanumöl; am meisten aber empfiehlt sich zum Aufhellen von Bakterienschnitten Xylol.

Die einzelnen Methoden, die bei der Färbung von Schnitten auf Bakterien zur Verwendung kommen, sind die folgenden:

## I. Gram'sche Färbung für Schnittpräparate.

S. S. 102. Die Färbung wird etwas länger vorgenommen wie bei Trockenpräparaten. In die Jodlösung werden die Schnitte entweder direkt aus der Farblösung, oder nachdem man sie für ganz kurze Zeit in 0,6-proz. Kochsalzlösung gebracht hat, mit dem Spatel übertragen, weil sie sich sonst stark kräuseln, oder man fängt die Schnitte aus der Kochsalzlösung mit dem Objektträger glatt auf, trocknet sie mit Fließpapier an und führt alle folgenden Prozeduren auf dem Objektträger aus.

Meist ist dann noch eine Nachfärbung am Platze, die am besten mit Bismarckbraun in folgender Weise bewirkt wird.

1) Der in Alkohol entfärbte Schnitt wird 2—5 Minuten in wässeriger oder alkoholischer Bismarckbraunlösung (s. S. 56) gefärbt.
2) Auswaschen in Alkohol absolut., bis der Schnitt gelbbraun geworden ist.
3) Xylol, Kanadabalsam.

Wenn man die Modifikation des Gram'schen Verfahrens von Claudius (s. S. 103) anwendet, so erhält man bei Nachfärbung nach van Gieson (s. S. 60) sehr instruktive Bilder. Zur Entwässerung sollen die Schnitte dann in absolutem Alkohol nur so lange, wie unumgänglich nötig ist, verweilen.

Auch vor der Bakterienfärbung kann schon eine Kernfärbung mit Pikrokarmin (S. 55) oder besser noch Lithionkarmin (S. 54) oder Alaunkarmin vorgenommen werden. Dieses Verfahren verdient im allgemeinen den Vorzug, da manche Bakterien durch die nachfolgende Färbung mit Bismarckbraun undeutlicher werden.

Weigert's Modifikation verändert das Entfärbungsmittel.

1) Härtung der Präparate in absolutem Alkohol.
2) Färben in einer gesättigten Anilinwassergentianaviolettlösung oder Methylviolettlösung 5—15 Minuten lang.
3) Kurzes Abspülen in 0,6-proz. Kochsalzlösung.
4) Der Schnitt wird auf dem Spatel oder auf dem Objektträger aus der Kochsalzlösung genommen und vorsichtig mit Fließpapier abgetrocknet.
5) 1—2 Minuten in Jodjodkalilösung auf dem Spatel oder Objektträger.

6) Abtrocknen mit Fließpapier.
7) Wiederholtes Entfärben in Anilinöl, bis dasselbe keine Farbe mehr annimmt.
8) Wiederholtes Entfernen des Anilinöls mit Xylol.
9) Kanadabalsam.

Die Methode gibt sehr gute Bilder. Es färben sich nur die Spaltpilze (und etwa vorhandenes Fibrin) tiefblau. Will man auch das Gewebe sichtbar machen, so färbt man vorher 3 Minuten lang in Alaunkarmin oder Lithionkarmin (s. S. 54) und bringt die Schnitte aus dem Wasser, in welchem der salzsaure Spiritus entfernt wurde, in die Anilinwassergentianaviolettlösung. Die Färbung mit Lithionkarmin muß vorher geschehen, weil bei der Weigert'schen Färbung eine Entwässerung in Alkohol unzulässig ist.

Kromayer empfiehlt, namentlich für Hautpräparate, statt der Entfärbung unter 7 eine solche in Acetonxylol 1 : 5—5,5. So sollen Mikroorganismen, Fibrin, kollagenes Gewebe, Epithelfasern usw. zu gleicher Zeit gefärbt werden.

Löffler's Modifikation der Gram'schen Färbung.

1) Übertragen der Schnitte aus Alkohol in Methylviolett 6B oder Methylviolett BN, in 1—2½-proz. Karbolwasser im Verhältnis 1 : 10 gelöst. Färbung 2—10 Minuten.
2) Abspülen in Wasser.
3) 2 Minuten in Jodjodkaliumlösung oder in Unnas Jodkaliumwasserstoffsuperoxydgemisch. (Man bringt unmittelbar vor Gebrauch ein kleines Stückchen Jodkali in Wasserstoffsuperoxyd.)
4) 1 Minute in 5-proz. wässeriger Salpetersäure resp. Schwefelsäure oder 10 Sekunden in 3-proz. Salzsäure-Alkohol.
5) Vollständige Entfärbung in absolutem Alkohol oder 30-proz. Acetonalkohol.
6) Xylol, Kanadabalsam.

Zur Kontrastfärbung kann man die Schnitte nach der Entfärbung kurze Zeit in eine verdünnte Fuchsinlösung bringen und dann in Alkohol auswässern. Eine sehr schöne Färbung wird erzielt, wenn man zu 10 ccm der Karbol-Methylviolett-6B-Lösung 1 ccm alkoholischer Methylenblaulösung hinzugibt.

### II. Löffler'sche Methylenblaufärbung.

1) Färben in Löffler's Methylenblau (s. S. 101) 3—4 Minuten lang.
2) 10—20 Sekunden lang in 0,5-proz. bis 1,0-proz. Essigsäure.
3) Entwässern in Alkohol; Xylol, Kanadabalsam.

Man kann auch der Essigsäure zur stärkeren Entfärbung so viel Tropäolin zusetzen, daß sie eine hellgelbe Farbe erhält.

### III. Färbung in Gentianaviolett.

1) Färbung in 2-proz. wässeriger oder in ebenso starker alkoholischer Gentianaviolettlösung, bis die Schnitte dunkelviolett geworden sind.
2) Auswaschen in absolutem Alkohol, bis eine hellviolette Färbung erzielt ist.
4) Xylol, Kanadabalsam.

Diese Methode gibt bei vielen Bakterien, namentlich z. B. bei Milzbrandbazillen, ausgezeichnete Resultate. Es wird eine ganz distinkte hellviolette Färbung der Kerne erzielt, von denen sich die Bazillen durch ihre gesättigtere Färbung scharf abheben.

In einzelnen Fällen ist es praktisch, die Schnitte aus der Farbe und vor dem Auswaschen in Alkohol für 10—20 Stunden in 5-proz. Essigsäure zu bringen.

**IV. Fuchsinfärbung nach PFEIFFER.**

1) Alkoholhärtung.
2) Färben $^1/_2$ Stunde lang oder länger in Karbolfuchsinlösung (S. 101) 1 : 20 Aqu. destillata.
3) Auswaschen in einer Schale destillierten Wassers, dem 1 Tropfen Eisessig zugesetzt ist, bis der Schnitt grauviolett aussieht.
4) Alkohol, Öl, Kanadabalsam.

**V. Methylenblaumethode von KÜHNE.**

1) Übertragen der Schnitte aus dem Alkohol in eine Lösung von

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 1,5 |
| Alkohol absolut. | 10,0 |
| 5-proz. Karbolwasser | 100,0 |

$^1/_2$—2 Stunden lang (letzteres bei Leprabazillen).
2) Schnelles Abspülen im Wasser.
3) Auswaschen in angesäuertem Wasser, 2 Tropfen Salzsäure : 100 Wasser, bis die Schnitte blaßblau geworden sind.
4) Abspülen in einer Lösung von kohlensaurem Lithion: 6—8 Tropfen konzentrierte Lösung von kohlensaurem Lithion auf 10 ccm Wasser.
5) Übertragen in reines Wasser, 3—5 Minuten lang.
6) Kurzes Verweilen in absolutem Alkohol.
7) Übertragen in Methylenblau-Anilinöl (1 Messerspitze voll auf 10,0 Anilinöl gelöst; von dieser Lösung vor dem Gebrauch zu reinem Anilinöl so viel zugesetzt, bis der gewünschte Farbenton erzielt ist).
8) Reines Anilinöl.
9) Übertragen in ätherisches Öl, z. B. Tereben.
10) Xylol.
11) Kanadabalsam.

(Anm. Tereben wird durch Mischung und wiederholte Destillation von Terpentinöl mit Schwefelsäure erhalten.)

Die etwas umständliche Methylenblaumethode von KÜHNE ist auf verhältnismäßig viele Bakterienarten anwendbar; auch schwieriger zu färbende Bazillen treten durch sie deutlich hervor. Will man neben der Bakterienfärbung auch noch eine scharfe Kernfärbung erzielen, so wäscht man nicht in angesäuertem Wasser, sondern statt dessen in stark verdünnter wässeriger Lösung von Chlorhydrinblau aus.

**VI. Thioninmethode von NICOLLE** färbt alle Bakterien metachromatisch.

Färbung 2—5 Minuten in einer Mischung von 100 Teilen 1-proz. Karbolwassers und 10 Teilen konzentrierter alkoholischer (50-proz.) Thioninlösung; Abspülen in Wasser, Alkohol, Xylol, Balsam.

### VII. Trockenmethode von Unna.

Manche Bakterien werden bei der Entwässerung des Schnittes in Alkohol ganz oder teilweise entfärbt. Diesem Nachteil begegnet die Trockenmethode von Unna.

Der gefärbte Schnitt kommt aus der Entfärbungsflüssigkeit in Wasser und wird dann auf dem Objektträger ausgebreitet. Nun wird das Wasser durch mehrmaliges Aufdrücken von Fließpapier möglichst entfernt, und dann der Objektträger über der Flamme schnell bis zum vollständigen Austrocknen des Schnittes erhitzt. Nach dem Erkalten erfolgt sofort Einschluß in Kanadabalsam.

### VIII. Polychrome Methylenblaufärbung von Zieler.

Sie ist besonders für schwer färbbare Bakterien-, Rotz-, Typhus-, Unna-Ducrey'sche Streptobazillen, Gonokokken usw. geeignet.

1) Beliebige Fixierung und Härtung (am besten Formol-Müller).
2) Paraffineinbettung (aus Celloidinschnitten muß vorher das Celloidin entfernt werden).
3) Färben 8—24 Stunden im Pranter's Orceïnlösung.

| | | |
|---|---|---|
| Orceïn D (Grübler) | 0,1 | g |
| Officin. Salpetersäure | 2,0 | ccm |
| 70-proz. Alkohol | 100,0 | „ |

4) Kurzes Abspülen in 70-proz. Alkohol.
5) Abspülen in Wasser.
6) Färben in polychromem Methylenblau 10—30 Minuten bis 2 Stunden (bei Sublimat- und Alkoholfixierung nicht länger als höchstens 1 Stunde).
7) Abspülen in destilliertem Wasser.
8) Gründliches Differenzieren in Unna's Glycerinäthergemisch.
9) Gründliches Abspülen in Wasser.
10) 70-proz. Alkohol-, absoluter Alkohol-Xylol-Balsam.

Bakterien und Kernstrukturen dunkelblau, Protoplasma hellgrau-blau, elastische Fasern rotbraun, Untergrund farblos.

IX. Sehr geeignet zur Darstellung der gramnegativen Bakterien im Schnitt sind auch eine Reihe neuerer Färbungen, die gleichzeitig die Leukocytenkörnelungen und feineren Zellstrukturen hervortreten lassen, so die Methoden von Schridde mit Giemsalösung, von Zieler mit May-Grünwald'schem Gemisch und Pappenheim's Methylgrün-Pyronin-Färbung (s. Kap. XIV Blut).

## Schnittpräparate von Agar- und Gelatinekulturen.

Zu dem Zwecke sticht man die Agar- oder Gelatinekultur aus oder entfernt sie durch leichtes Erwärmen des Reagenzglases. Man kann auch das letztere zerschlagen. Der Gelatine- oder Agarstich wird dann in 85—95-proz. Spiritus übertragen, gehärtet, später aufgeklebt und mit dem Mikrotom geschnitten.

Neisser empfiehlt, die Stiche zunächst je nach der Größe für 1—8 Tage in eine 1-proz. Lösung von doppelchromsaurem Kali zu übertragen und der Einwirkung des Lichtes auszusetzen. Dann gründliches Auswaschen in Wasser und Härtung erst in 70-proz., dann in 95-proz. Alkohol.

Die Färbung geschieht in den gewöhnlichen Lösungen von Anilinfarben. Gelatine und Agar selbst geben sowohl in Alkohol wie in Anilin den Farbstoff ab. Ähnlich wie bei Stichkulturen verfährt man auch bei Plattenkulturen.

## J. Übersicht über die Färbung der verschiedenen pathogenen Bakterien.

### I. Kokken.

**Eiterkokken.**

Die gewöhnlich im Eiter vorkommenden verschiedenen Kokkenarten, der Staphylococcus pyogenes aureus, citreus, flavus und albus, sowie der Streptococcus pyogenes färben sich alle gut mit den gewöhnlichen wässerigen Anilinfarblösungen, namentlich mit Gentianaviolett und mit Löffler's Methylenblau.

Sie lassen sich sämtlich auch nach Gram (s. S. 102) färben, und diese Methode ist deshalb besonders zu empfehlen, weil die zahlreichen Eiterkörperchen, die sonst das scharfe Hervortreten der betreffenden Kokkenart erheblich beeinträchtigen, entfärbt werden. Auch hat das Gelingen der Gram'schen Färbung eine differentiell-diagnostische Bedeutung gegenüber anderen ähnlich aussehenden Kokken.

Für Schnitte ist ebenfalls die Gram'sche Färbung (s. S. 110) mit nachfolgender Färbung in Bismarckbraun oder die Weigert'sche Färbung (s. S. 110) mit vorhergehender Lithionkarminfärbung zu empfehlen.

Es ist zu beachten, daß die genannten Kokken nicht nur bei Abszessen und Phlegmonen, sondern auch bei Osteomyelitis, Pyämie, akuter Endocarditis, Endometritis, eitriger Meningitis usw. gefunden werden.

Die Gallerthülle des Streptococcus mucosus ist meist schon bei einfacher Färbung mit verdünnter Fuchsinlösung sichtbar; ev. Kapselfärbung (s. S. 108).

**Erysipelkokken.**

Der dem Streptococcus pyogenes morphologisch so sehr ähnliche Streptococcus des Erysipels verhält sich auch Farblösungen gegenüber ganz gleich. Er färbt sich auch gut nach Gram.

**Pneumococcus** von Fraenkel-Weichselbaum.

Der lanzettförmige Diplococcus von Frafnkel-Weichselbaum kommt am häufigsten bei Pneumonie vor; er ist von einer Kapsel umgeben, die bei der gewöhnlichen Färbungsmethode ungefärbt bleibt. Zu beachten ist aber, daß er sich nicht nur in der Lunge bei croupöser Pneumonie findet, sondern daß er namentlich auch in den Exkreszenzen der frischen Endocarditis und in dem Eiter der Cerebrospinalmeningitis oft nachgewiesen ist. Er färbt sich mit den gewöhnlichen wässerigen Farblösungen. Sehr bewährt hat sich auch die Färbung in Karbolfuchsin (Fuchsin 1; 5-proz. Karbolwasser 100). Bei mehrstündigem Verweilen in der Lösung erscheint der Coccus selbst intensiv rot gefärbt, die Kapsel hat einen leichten rötlichen Farbenton. Wegen der Kapseldarstellung s. S. 108.

Der Pneumoniecoccus von Fraenkel-Weichselbaum färbt sich, was besonders hervorzuheben ist, auch nach Gram; es ist das ein für die Differentialdiagnose sehr wichtiger Unterschied gegenüber dem Kapselbazillus Friedländer's.

**Micrococcus tetragenus** wird mit wässerigen Farblösungen oder nach der Gram'schen Methode gefärbt.

**Gonokokken.**

Die Gonokokken liegen zum großen Teil innerhalb der Eiterzellen, und es erleichtert diese charakteristische Lage die Diagnose sehr. Die Untersuchung geschieht an Deckgläsern, die mit dem Eiter der Harnröhrenschleimhaut, der Cervixschleimhaut, der Tube usw. oder der Konjunktiva bestrichen sind.

In Tripperflecken auf Wäsche kann man die Gonokokken noch nach langer Zeit nachweisen, wenn man die Schüppchen abschabt, in Wasser aufquellen läßt und dann auf dem Deckglas färbt.

Die Färbung frischen, nicht fixierten Eiters, welche eine sehr schnelle Diagnose gestattet, wird mit Neutralrot bewirkt. Von diesem setzt man ein Körnchen in Substanz oder 1 Tropfen einer kalt gesättigten Lösung 1 : 100 Kochsalzlösung zu dem Eiter. Die intrazellulären Gonokokken sind dann die ersten Elemente, die den Farbstoff annehmen.

Auch fixierte Präparate färben sich schnell in kalt gesättigter Neutralrotlösung 20 : 100 Wasser.

Die Färbung fixierter Präparate geschieht mit wässerigen Farblösungen. Nach Gram entfärben sich die Gonokokken, was für die Differentialdignose von Wichtigkeit ist.

Eine Doppelfärbung erreicht man nach folgender Methode:

1) Färben 2—3 Minuten lang in alkoholischer Eosinlösung, eventuell in der Wärme.
2) Absaugen des überschüssigen Eosins mit Fließpapier.
3) Färben $^1/_2$ Minute lang in alkoholischer Methylenblaulösung.
4) Abwaschen in Wasser.

Es erscheinen dann die Kokken blau, die Zellen rot.

J. Schütz empfiehlt folgendes Verfahren:

1) Färben der Deckglastrockenpräparate in einer gesättigten Lösung von Methylenblau in 5-proz. Karbolwasser, 5 bis 10 Minuten lang.
2) 3 Sekunden lang Verweilen in Essigsäurewasser: Acid. acetic. dilut. 5 Tropfen: Aqua 20.
3) Gründliches Abspülen in Wasser.
4) Nachfärben in sehr verdünnter Safraninlösung.
5) Trocknen mit Fließpapier. Kanadabalsam.

Auch die Doppelfärbung von Pick-Jacobson (S. 101) gibt gute Resultate.

Auf einem ähnlichen Prinzip wie diese beruht die Färbung von Lang: Vorrätig zu haltende gesättigte Lösungen von Thionin und Fuchsin in 2-proz. Karbolwasser werden vor dem Gebrauch im Verhältnis 4 : 1 gemischt. Färben $^1/_4$—$^1/_2$ Minute. Gonokken durch das Thionin stark gefärbt.

Für Schnittpräparate empfiehlt Touton Färbung mit Karbolfuchsin und nachfolgendes Auswaschen in Alkohol. Besonders aber sind die Zieler'sche Färbung (S. 119), sowie die S. 119 unter IX. angeführten Methoden zu empfehlen.

**Mikrococcus catarrhalis** in Nasenrachenhöhle, Bronchien und Konjunktiva vorkommend, ist dem Gonococcus außerordentlich ähnlich, nur liegt er meist spärlicher intrazellulär. Die Färbung geschieht auf gleiche Weise. Unterscheidung meist nur durch Kultur möglich.

**Diplococcus intracellularis meningitidis.** (Meningococcus.)

Färbt sich am besten mit Methylenblau, in Deckglastrockenpräparaten leicht, in Schnitten etwas schwieriger. Ausstrich- und Kulturpräparate lassen sich manchmal nach Gram färben, Schnitte nicht. (Der Weichselbaum'sche Typus gilt als gramnegativ, der Jaeger'sche als grampositiv.) Sonstige Färbung wie beim Gonococcus.

## II. Bazillen.

### Friedlaender's Kapselbacillus.

Der Friedländer'sche Kapselbacillus färbt sich ebenfalls gut mit wässerigen Farblösungen, wobei die Kapsel ungefärbt bleibt. Er entfärbt sich nach Gram.

Über die Kapselfärbung s. S. 108.

### Bazillen des Rhinoskleroms.

Der bei Rhinosklerom gefundene Bacillus besitzt eine Schleimhülle, ähnlich dem Friedländer'schen Kapselbacillus; er unterscheidet sich aber von diesem sehr wesentlich dadurch, daß er sich nach Gram färbt.

Wolkowitsch hat folgende Färbungsmethoden angegeben:

A. Schnitte.

1) Färben 24—48 Stunden lang in Anilinwassergentianaviolett.
2) Abspülen in Wasser.
3) 1—4 Minuten lang in Jodjodkalilösung.
4) Übertragen in absoluten Alkohol.
5) Nelkenöl, in welchem den Schnitten noch ziemlich viel Farbe entzogen wird.

Statt Jodjodkalilösung kann man auch Pikrinsäure in wässerig-alkoholischer Lösung anwenden. Da diese aber viel schneller entfärbt, so verweilen in ihr die Schnitte nur einige Sekunden.

Die Kapseln färben sich nur gut an in Alkohol gefärbten Präparaten.

Die hyalinen Massen im Rhinosklerom färben sich nach Wolkowitsch intensiv mit Methylviolett, Gentianaviolett, Methylenblau und Fuchsin, weniger mit Safranin, gar nicht mit Hämatoxylin, dagegen sehr gut in Eosin. Daher ist Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sehr zu empfehlen.

B. Deckglaspräparate von Kulturen.

1) Antrocknen usw.
2) Einige Sekunden in 1-proz. Essigsäure.
3) Trocknen.

4) 1 Minute lang in starke Anilinwassergentianaviolettlösung.
5) Abspülen in Wasser.
6) Einige Sekunden lang in 1—2-proz. Eosinlösung.
7) Übertragen in 60-proz. Alkohol.
8) Wasser.
9) Trocknen. Kanadabalsam.

Stepanow empfiehlt für Schnitte folgendes Verfahren:

1) Färben $^1/_4$—1 Stunde lang in Karbolgentianaviolett oder 24—36 Stunden lang in Löffler's Methylenblaulösung.
2) Sehr kurze Extraktion mit $^1/_4$—$^1/_5$-proz. essigsäurehaltigem Spiritus oder einfach mit Spiritus.

**Milzbrandbazillen.**

Die Milzbrandbazillen färben sich gut in den gewöhnlichen wässerigen Lösungen, auch in Safranin 3,0 : 100 Wasser, bei Siedehitze gelöst, nach dem Erkalten filtriert. Diese Färbung soll nach Ott die Struktur besonders deutlich hervortreten lassen. Sie färben sich auch gut nach Gram.

Für Schnittpräparate ist diese letztere Färbung mit nachfolgender Bismarckbraunfärbung (s. S. 110) anzuwenden oder die Weigert'sche Färbung (s. S. 110) mit vorheriger Färbung in Lithionkarmin. Außerdem gibt aber auch gerade bei Milzbrandschnittpräparaten die einfache Färbung in starker wässeriger Gentianaviolettlösung und nachheriges Auswaschen in absolutem Alkohol (s. S. 111) sehr gute Bilder. Die Kerne sind hellblau, die Milzbrandbazillen dunkelblau gefärbt.

Die Sporenfärbung wird in der S. 106 erwähnten Weise vorgenommen.

Die Gallerthülle wird besonders nach der Methode von Johne (s. S. 108) sichtbar gemacht.

**Bazillen des malignen Ödems.**

Die Bazillen des malignen Ödems sind etwas schlanker als die Milzbrandbazillen, denen sie sonst sehr ähnlich sehen. Sie färben sich in wässerigen Lösungen von Gentianaviolett; nach Gram entfärben sie sich (s. jedoch Modifikation von Claudius, S. 103, 110).

**Tetanusbacillus.**

Färbt sich gut in wässerigen Anilinfarbstofflösungen; auch nach der Gram'schen Methode gelingt die Färbung. Sporenbildend.

**Rauschbrandbacillus.**

Färbt sich gut in den gewöhnlichen wässerigen Farbstofflösungen; nach Gram wird er entfärbt (s. jedoch Modifikation von Claudius S. 103).

**Bacillus phlegmonis emphysematosae.**

Plumpe Stäbchen, färbbar mit Anilinfarben und nach Gram. Gelegentlich Kapselbildung.

**Bacillus pyocyaneus.**

Schlanke Stäbchen, mit Anilinfarben und nach Gram. Endständige Geißel.

**Bacillus der Mäuseseptikämie.**

**Bacillus des Schweinerotlaufs.**

Beide sind einander in ihrem morphologischen und tinktoriellen Verhalten sehr ähnlich. Sie färben sich leicht mit wässerigen Farblösungen und nach der GRAM'schen Methode.

**Rotzbazillen.**

Sie färben sich nicht nach GRAM. Die einfachen wässerigen Lösungen färben zwar Deckglaspräparate, aber wenig intensiv. Alkalische Lösungen färben viel besser; ebenso Anilinwassergentianaviolettlösung, der gleiche Teile einer Kalilösung 1 : 10,000 zugesetzt sind. Die Mischung muß jedesmal frisch bereitet werden. Vor dem Auswaschen kann in einer schwachen Essigsäurelösung (1-proz.), der etwas Tropäolin zugesetzt ist, kurze Zeit entfärbt werden. Das letztere hat den Vorteil, daß es das Zellprotoplasma ganz, und die Kerne wenigstens etwas entfärbt und so die Bazillen deutlich hervortreten läßt.

Die Färbung (nach LÖFFLER) ist demnach folgende:

1) Färben 5 Minuten lang in alkalischer Methylenblaulösung oder Anilinwassergentianaviolettlösung mit Kalizusatz.

2) 1 Sekunde in durch Tropäolin weingelb gefärbte Essigsäure.

3) Schnelles Auswaschen in destilliertem Wasser.

4) Alkohol — Öl — Kanadabalsam.

Gewebsschnitte werden ebenso gefärbt; zur partiellen Entfärbung dient aber statt der Tropäolinessigsäure 5 Sekunden langes Verweilen in

| | |
|---|---|
| Aqua destillata | 10,0 |
| konzentrierte schweflige Säure | 2 Tropfen |
| 5-proz. Oxalsäure | 1 Tropfen. |

Empfehlenswert ist es noch, wenn man die Schnitte unmittelbar vor der Färbung einige Minuten in Kalilösung 1 : 10000 legt.

Es gelingt aber auch mit dieser Methode nicht, eine ganz isolierte Färbung der Rotzbazillen herbeizuführen.

KÜHNE empfiehlt zur Färbung der Rotzbazillen das von ihm angegebene Methylenblauverfahren (s. S. 112). Man kann mit demselben auch eine Doppelfärbung verbinden, wenn man dem zum Aufhellen benutzten Terpentinöl etwas Safranin zusetzt.

SCHÜTZ hat für Schnitte das folgende Verfahren empfohlen:

1) Färben 24 Stunden lang in:
konz. alkohol. Methylenblaulösung } zu gleichen
Kalilauge 1 : 1000 } Teilen.

2) Auswaschen in angesäuertem Wasser.

3) 5 Minuten in absolutem Alkohol.

4) Cedernöl, Kanadabalsam.

Alle Methoden haben den Nachteil, daß sie häufig das Gewebe selbst zu stark mitfärben, oder das bei genügender Entfärbung des Gewebes auch ein Teil der Bazillen die Farbe verliert. Um diesen Nachteilen zu begegnen, empfiehlt NONIEWICZ folgendes Verfahren:

1) Färben 2—5 Minuten in der LÖFFLER'schen Methylenblaulösung.

2) Auswaschen in destilliertem Wasser.

3) Entfärben, 1—5 Sekunden lang, je nach der Dicke der Schnitte in einer Lösung von
   $^1/_2$-proz. Essigsäure 75 Teile
   $^1/_2$-proz. wässerige Lösung von Tropäolin (00) 25 „
4) Auswaschen in destilliertem Wasser.
5) Ausbreiten auf dem Objektträger, Entwässern der Schnitte, zunächst mit Fließpapier, dann an der Luft oder über der Spiritusflamme.
6) Aufhellen durch fortwährend aufgetropftes Xylol (Nelken-, Origanum-, Anilinöl zu vermeiden).
7) Kanadabalsam.

Die Rotzbazillen erscheinen dunkel- bis schwarzblau, das Gewebe hellblau gefärbt. Für Schnitte eignet sich auch das von NIKIFOROFF (s. S. 130) angegebene Färbeverfahren für Rekurrensspirillen, sowie die S. 113) unter VIII. und IX. angegebenen Färbungen.

**Influenzabacillus.** Sehr kleine Kurzstäbchen.

Die Färbung gelingt verhältnismäßig nur schwer, am besten mit verdünntem Karbolfuchsin oder LÖFFLER's Methylenblau. Nach GRAM werden die Bazillen entfärbt.

**KOCH-WEEK'scher Bacillus** (aegyptiacus)

bei epidemischer Konjunktivitis gefunden. Dem Influenzabacillus außerordentlich ähnlich.

**MORAX-AXENFELD'scher Diplobacillus**

ziemlich große, plumpe, oft zu zweien angeordnete Stäbchen, bei Konjunktivitis gefunden. Wird nach GRAM entfärbt. Färbbar mit den gewöhnlichen Farblösungen.

**Pestbacillus.**

Stäbchen von verschiedener Größe, unbeweglich, ohne Geißeln, manchmal dem Bacterium coli ähnlich, an den Enden oft etwas abgerundet. Mit der LÖFFLER'schen Geißelfärbung ist manchmal eine Kapsel nachweisbar. Färben sich mit den gewöhnlichen Färbemethoden, oft an den Enden stärker. Diese Polfärbung gelingt am besten, wenn die Erhitzung etwas stärker vorgenommen war und die Trockenpräparate noch 25 Minuten mit absolutem Alkohol behandelt werden. Färbung 2—3 Minuten in LÖFFLER'schem Methylenblau. Nach GRAM entfärben sich die Pestbazillen.

Ausstrichpräparate von Blut oder Organsaft kann man nach GOTSCHLICH durch momentane Einwirkung unverdünnter Karbolfuchsinlösung und sofortiges Abspülen mit Wasser färben.

Zur Färbung der Pestbazillen in Schnitten verfährt man nach GAFFKY folgendermaßen: Konservierung in Alkohol oder einem Gemisch von Eisessig 10,0, Chloroform 30,0 und Alkohol, 96-proz., 60,0, Paraffineinbettung, Färben 2—3 Stunden in schwacher wässeriger Methylenblaulösung, schnell in Alkohol absolutus, Xylol, Balsam. Oder Färbung 24 Stunden in konzentrierter Lösung von Fuchsin in Glyzerin, kurze Entfärbung in schwacher Essigsäure, Alkohol, Xylol, Balsam.

Schnittfärbung nach Kossel:

1) Färben 2 Stunden in folgender Lösung:

Konzentr. wässerige Lösung von

| | |
|---|---|
| Methylenblau officin. Höchst | 5 ccm |
| Aqua destill. | 50 ccm |
| 5-proz. Kristallsoda | 15 Tropfen. |

Dazu wird unter Umschütteln 2,5—5 ccm einer 1-proz. wässerigen Lösung von Eosin A extra Höchst tropfenweise zugesetzt, ohne daß ein Niederschlag entsteht. Die Mischung muß jedesmal frisch bereitet werden.

2) Differenzieren in 2-proz. Essigsäure bis zum Rosaton.

3) Abspülen in Wasser.

4) Schnelles Entwässern in Alkohol, Xylol, Balsam. Bazillen dunkelblauviolett, Gewebe rosa; zuweilen ist auch die Polfärbung zu sehen.

**Streptobacillus des Ulcus molle** (Ducrey-Unna).

Er färbt sich in Ausstrichpräparaten gut mit alkoholischen Lösungen von Fuchsin, Methylviolett oder Gentianaviolett. In Schnitten färbt man ihn nach Unna folgendermaßen:

1) Behandlung der aus Alkoholhärtung kommenden Schnitte in

Methylenblau

| | |
|---|---|
| Kalii carbonici ana | 1,0 |
| Aqua dest. | 100,0 |
| Spiritus | 20,0 |
| M. Coque ad remanent. | 100,0 |

Adde Methylenblau

| | |
|---|---|
| Boracis aa. | 1,0 |
| in Aqua dest. | 100,0; soluta misce. |

2) Abtrocknen der überfärbten Schnitte auf dem Objektträger mit Löschpapier.

3) Entfärben einige Sekunden in Unna's Glyzerinäthermischung (von Schuchardt in Görlitz).

4) Erneutes Abtrocknen.

5) Alk. abs. Bergamottöl, Kanadabalsam.

Loth empfiehlt nach Formolhärtung und Celloidineinbettung folgende Färbungen:

A. 1) Polychromes Methylenblau (Grübler) 5 Min. 2) Abwaschen in Wasser. 3) Entfärben in verdünnter Glyzerinäthermischung. 4) Gründliches Abspülen in Wasser. 5) 80-proz. Alkohol, Alkohol-Äther, Alk. abs., Öl, Balsam. Neben Bazillenfärbung Darstellung der Plasma- und Bindegewebszellen.

B. 1) und 2) wie bei A. 3) 1 Minute in 1-proz. Lösung von rotem Blutlaugensalz. 4) Abwaschen in Wasser. 5) Alkohol absol.; dann auf den Objektträger. 6) Trocknen und Entfärben in 1-proz. salzsaurem Anilinöl. 7) Alkohol, Xylol, Balsam.

C. 1) und 2) wie bei A. 3) Entfärben in Tannin-Orangelösung (Grübler) bis die Schnitte gelb werden. 4) Auswaschen in Wasser. 5) Alkohol, Öl, Balsam. Bazillen blau auf gelbem Grunde.

**Typhusbazillen.**

Sie finden sich beim Abdominaltyphus in der Darmschleimhaut, im Lymphknötchenapparat, in den Mesenterialdrüsen, in der Milz, in der Leber, in den Dejektionen usw. Sie färben sich nicht nach Gram.

In Deckglaspräparaten sind sie mit den gewöhnlichen wässerigen Lösungen, namentlich auch mit Fuchsin zu färben. Die Färbung gelingt leichter bei Erwärmen. Auch Thionin ist ein geeignetes Färbemittel. Abspülen in Wasser (nicht Alkohol). In Schnitten unterscheiden sich die Typhusbazillen von einer Reihe von Fäulnisbazillen, denen sie sonst morphologisch sehr ähnlich sind, dadurch, daß sie keine so scharfe Färbung annehmen wie letztere. Für Schnitte sind als Farblösungen besonders geeignet Löffler's Methylenblau oder Karbolfuchsin. Es empfiehlt sich, die Schnitte 24 Stunden in der Farblösung zu belassen und nur kurz mit Alkohol zu behandeln.

Außerdem sind die Löffler'sche Methylenblaufärbung (s. S. 111) und die unter VIII und IX S. 119 aufgeführten Färbungen geeignet. Über Geißelfärbung s. S. 104.

**Paratyphusbazillen** verhalten sich färberisch den Typhusbazillen gleich.

**Bacterium coli commune.**

Das Bacterium coli commune färbt sich mit den gebräuchlichen Anilinfarben, namentlich mit Löffler'schem Methylenblau oder mit Karbolfuchsin. Bei der Gram'schen Methode wird es entfärbt.

**Diphtheriebacillus.**

In den diphtherischen Membranen findet sich eine Anzahl verschiedener Arten von Kokken und Stäbchen, die sich mit den gewöhnlichen Farblösungen gut tingieren. Außerdem aber hat Löffler ein Stäbchen beschrieben, das ziemlich kurz und etwas gekrümmt erscheint, und das sich besonders gut mit Löffler's Methylenblau, aber auch mit sonstigen wässerigen Farblösungen färbt und zu der Diphtherie in ätiologischer Beziehung steht. Nach Gram wird der Diphtheriebacillus nur dann entfärbt, wenn man zu starke Entfärbung anwendet.

Plaut empfiehlt als bestes Färbungsmittel 5 Teile konz. alkoholische Gentianaviolettlösung in 100 Teilen Anilinwasser. Bei schonender Anwendung des absoluten Alkohols vertragen hierbei die Bazillen die Gram'sche Färbung; noch besser ist es, wenn man statt des Alkohols zum Entfärben Anilinöl verwendet. Auch verdünntes Karbolfuchsin ist zur Färbung geeignet.

Von differentialdiagnostischer Bedeutung ist die Färbung auf metachromatische Polkörnchen nach M. Neisser. Das Material soll Kulturen entstammen, die bei 35° auf Löffler'schem Serum 9—20 Stunden lang gewachsen sind.

1) Färben der Deckglastrockenpräparate 1—3 Sekunden lang in

| | | |
|---|---|---|
| Methylenblau | 1,0 | |
| 96-proz. Alkohol | 20 | ccm dazu |
| Aqua destillata | 950,0 | |
| Eisessig | 50 | ccm |

2) Abspülen in Wasser.
3) Färben 3—5 Sekunden lang in filtrierter, bei Kochen hergestellter wässeriger Lösung von Bismarckbraun 2 : 1000.
4) Abspülen, Trocknen, Balsam.

Im braun gefärbten Bacillus treten, namentlich an den Polen 2—3 blaue Körnchen auf.

**M. Neisser's verbesserte Polkörnchenfärbung.**

1) Färben 1 Sekunde in frisch bereitetem Gemisch von 2 Teilen Lösung A und 1 Teil B.

| | | |
|---|---|---|
| A) | Methylenblau | 1,0 |
| | Alkohol (96-proz.) | 20,0 |
| | Aqua dest. | 1000,0 |
| | Eisessig | 50,0 |
| B) | Kristallviolett Höchst | 1,0 |
| | Alkohol | 10,0 |
| | Aqua dest. | 300,0 |

2) Abspülen mit Wasser.
3) Nachfärben mit filtrierter Chrysoidinlösung (Chrysoidin 1,0 in heißem Wasser 300,0 gelöst). 3 Sekunden lang.
4) Abspülen mit Wasser.
5) Trocknen, Balsam.

Scheller empfiehlt für beide Farbstoffe 10—15 Sekunden Färbedauer.

Ficker empfiehlt folgendes Verfahren: Zu 100 ccm einer Lösung von Methylenblau med. pur. Höchst 1 : 10 000 werden 2 ccm acid. lact. pur. gesetzt. Hiervon saugt man einige Tropfen mit Fließpapier unter dem mit feuchter Bakterienmasse beschickten Deckgläschen hindurch. Körnchen tiefblau, Stäbchen so gut wie farblos.

**Tuberkelbazillen.**

Die Färbungsmethode der Tuberkelbazillen beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die oben (S. 106) angegebene Sporenfärbung. Die mit bestimmten Farbstofflösungen einmal gefärbten Bazillen behalten ihre Färbung auch bei Entfärben mit stärkeren Lösungen von Mineralsäuren bei, während alles übrige im Präparat Befindliche, auch andere Bakterienarten entfärbt werden. Färbt man nun weiterhin mit einer zweiten Anilinfarbe in einfach wässeriger Lösung, die sich von der ersten für das Auge gut unterscheidet, mit einer sog. Kontrastfarbe, nach, so färbt diese die vorher entfärbten Kerne, Bakterien usw., während die Tuberkelbazillen diese zweite Farbe nicht annehmen.

Die von Koch in Anwendung gezogene Lösung war mit Kalilauge zusammengesetzt. Jetzt gebraucht man namentlich Lösungen, die mit Anilinöl oder Karbolsäure bereitet sind. Zur Anwendung kommt Anilinwasserfuchsin resp. Karbolfuchsin mit nachträglicher Kontrastfärbung in Methylenblau, und Anilinwassergentianaviolett resp. Karbolwassergentianaviolett und als nachträgliche Kontrastfarbe Bismarckbraun.

Nach Koch enthalten die Tuberkelbazillen zwei ungesättigte Fettsäuren; die eine ist in verdünntem Alkohol löslich und wird leicht durch Natronlauge verseift, die andere löst sich nur in siedendem absolutem Alkohol oder Äther und ist schwer verseifbar. Beide nehmen die spezifische Tuberkelbazillenfärbung an und behalten sie auch nach der Behandlung mit Salpetersäure und Alkohol; da hierbei die erste Fettsäure gelöst wird, so bleibt nur die zweite, in kaltem Alkohol unlösliche, zurück, und diese ist der Träger der eigentlichen Tuberkelbazillenfärbung.

Auch bei der Tuberkelbazillenfärbung wurde im Verlaufe der Untersuchungen das Erwärmen der Farbstofflösung als ein wichtiges Hilfsmittel

erkannt, welches namentlich eine ganz beträchtliche Abkürzung der Färbungszeit gestattet.

In neuerer Zeit ist die Tuberkelbazillenfärbung dadurch noch wesentlich vereinfacht worden, daß man durch Vermischen einer Mineralsäure und einer Methylenblaulösung die Entfärbung und die Kontrastfärbung in einer einzigen Prozedur vereinigt (B. Fraenkel, Gabbet); doch ist dieses Verfahren nicht so sicher, wie die älteren Methoden.

Außerdem hat sich herausgestellt, daß Karbolsäurefuchsin unerwärmt auch schon in kurzer Zeit die Tuberkelbazillen hinreichend intensiv färbt.

Die Methoden sind für Schnitte und Trockenpräparate annähernd dieselben, nur ist es angebracht, Schnitte länger, bis zu 24 Stunden, in der Farbe zu lassen, eventuell bei Brütofentemperatur.

Für die am häufigsten in der Praxis vorkommende Untersuchung von Sputum verfährt man so, daß man aus demselben die mehr bröckligen Partien mit der Pinzette entnimmt und entweder mit dieser auf dem Deckglas verteilt oder die Verteilung auf dem Deckglase so bewirkt, daß man ein zweites Deckglas daran abreibt: dann lufttrocken werden lassen, dreimal durch die Flamme ziehen und Färben nach einer der unten folgenden Methoden. Sehr bequem ist auch, die Verteilung des Materials auf dem Objektträger vorzunehmen und nach der Färbung ohne Deckgläschen direkt mit Immersionsöl zu bedecken.

Um auch vereinzelte Tuberkelbazillen im Sputum und in anderen flüssigen Medien nachweisen zu können, sind mehrere Sedimentierungsverfahren empfohlen worden.

### A. Sedimentierungsverfahren von Biedert.

15 ccm des zu untersuchenden Sputums werden mit etwa 2 Eßlöffel voll Wasser und mit — je nach der Dicke des Sputums — 4—8 Tropfen (nicht mehr!) Natronlauge verrührt, unter fortwährendem Umrühren in einer Schale gekocht und allmählich noch 4—6 Eßlöffel Wasser zugesetzt, bis eine dünnflüssige Masse entsteht. Dann läßt man in einem Spitzglas 2 Tage lang sedimentieren, gießt die Flüssigkeit ab, welche über dem Sediment steht, und untersucht dasselbe. Da das Sediment oft viel von der Klebrigkeit des ursprünglichen Sputums verliert, so tut man gut, von letzterem etwas zum Aufkleben des Sediments auf dem Deckglas aufzubewahren. Sehr vorteilhaft wird das Sedimentierungsverfahren nach vorherigem Kochen mit Natronlauge durch die Zentrifuge ersetzt.

### B. Sedimentierungsverfahren von Stroschein.

5—10 ccm Sputum werden je nach der Konsistenz mit der 1—3-fachen Menge einer Mischung von Borax-Borsäurelösung und Wasser im Verhältnis 1 : 3 gemischt und 1 Minute lang energisch geschüttelt. Nach 24—28 Stunden ist die Sedimentierung vollendet, man untersucht das Sediment, nachdem man die darüberstehende klare Flüssigkeitsschicht abgegossen hat.

Handelt es sich um den Nachweis von Tuberkelbazillen in Geweben zu rein diagnostischen Zwecken, ohne daß es auf das Lageverhältnis der Bazillen zu den einzelnen Bestandteilen des Gewebes ankommt, so nimmt man ebenfalls am besten zunächst eine Untersuchung des abgestrichenen Gewebssaftes in Deckglastrockenpräparaten vor, da dieselbe natürlich viel schneller und einfacher zu bewerkstelligen ist, als die Untersuchung von Schnittpräparaten. Wenn die Untersuchung des Gewebssaftes nicht zum Ziel führt, kann man noch die Untersuchung von

Schnitten anreihen. Die einzelnen jetzt im Gebrauch befindlichen Methoden der Tuberkelbazillenfärbung sind folgende:

Färbungen: I. Verfahren von Ehrlich mit der Modifikation der Beschleunigung der Färbung durch Erwärmen.

1) Färben 3—5 Minuten lang in Anilinwasserfuchsinlösung (resp. Anilinwassergentianaviolett) (s. S. 101.)
2) Entfärben $^1/_2$—1 Minute, in 20-proz. Salpetersäure oder 3-proz. Salzsäure.
3) Auswaschen in 70-proz. Alkohol, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird.
4) Nachfärbung in Methylenblaulösung (resp. Bismarckbraun) $1^1/_2$—2 Minuten.
5) Auswaschen in Wasser.
6) Trocknen zwischen Fließpapier.
7) Kanadabalsam.

Anmerk. Schnitte werden länger gefärbt und kommen aus dem Wasser in Alkohol, dann in Xylol und schließlich in Kanadabalsam.

II. Verfahren von Ziehl-Neelsen.

1) 1—5 Minuten langes Färben in erwärmter Lösung von Karbol-Fuchsin (s. S. 101).
2) Entfärben in 25-proz. Schwefelsäure, 20-proz. Salpetersäure oder salzsaurem Alkohol (Alkohol 90-proz. 100 ccm Aqu. dest. 200 ccm, dazu 20 Tropfen reine Salzsäure).
3) Auswaschen in 70-proz. Spiritus.
4) Kontrastfärbung in wässeriger Methylenblaulösung $1^1/_2$—2 Minuten.
5) Abwaschen in Wasser.
6) Trocknen zwischen Fließpapier.
7) Kanadabalsam.

Anmerk. Bei Schnitten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

III. Verfahren von Gabbet.

1) Färben 2 Minuten lang (ohne Erwärmen) in:

| | |
|---|---|
| Fuchsin | 1,0 |
| Alkohol | 10,0 |
| 5-proz. Karbolsäurewasser | 100,0 |

2) Abwaschen in Wasser.
3) 1 Minute lang Entfärbung und Kontrastfärbung in:

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 2,0 |
| 25-proz. Schwefelsäure | 100,0 |

4) Auswaschen in Wasser.
5) Trocknen und Kanadabalsam; bei Schnitten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Das Verfahren von Gabbet ist sehr einfach, weil die Erwärmung fortfällt und Entfärbung und Kontrastfärbung in eine Prozedur vereinigt sind; außerdem sind die beiden Farblösungen sehr bequem zu bereiten.

Die Methode ist aber nicht so zuverlässig, wie z. B. diejenige von Ziehl-Neelsen und namentlich die von Ehrlich, die daher bei zweifelhaften Fällen immer herangezogen werden sollte.

Nach Müller kann man die Entfärbung statt durch Säure auch durch 5—10-proz. Kaliumperkarbonat mindestens $^1/_4$ Stunde lang oder durch alkalisches Wasserstoffsuperoxyd vornehmen. Längere Einwirkung soll nicht schaden. Diese Methode ist bei sehr spärlichen Bazillen geeignet, und auch für Sporenfärbung brauchbar.

IV. Verfahren von Czaplewsky.

Dasselbe geht von der Voraussetzung aus, daß durch die starke Mineralsäure ein Teil der vorhandenen Tuberkelbazillen entfärbt wird und so dem Untersucher entgehen kann. Es wird daher statt der Mineralsäure Fluorescein angewandt. Das Verfahren, welches hauptsächlich für Deckglaspräparate angegeben ist, ist folgendes:

1) Färben in erwärmtem Karbolfuchsin.
2) Abtropfenlassen des überschüssigen Karbolfuchsins, und Übertragen in eine Lösung von
   Gelbes Fluorescein, konzentrierte alkoholische Lösung, Methylenblau im Überschuß.

In diese Lösung wird das Deckglas 6—10 mal eingetaucht, indem man die Flüssigkeit immer langsam wieder abfließen läßt.

3) Nachfärben in konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung.
4) Schnelles Abspülen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Bei Schnitten, in denen es auf das Auffinden ganz vereinzelter Tuberkelbazillen ankommt, sind die Methoden von Ehrlich und Neelsen beizubehalten, weil sie eher gestatten, die Färbung beliebig lange auszudehnen und dementsprechend die Färbung zu modifizieren.

Handelt es sich darum, neben der Bazillenfärbung auch feinere Gewebsveränderungen in den Schnitten darzustellen, so kann man die beiden Methoden von Wechsberg (Ziegler's Beiträge Bd. 29) anwenden, deren zweite eine Kombination mit elastischer Faserfärbung ist.

A. 1) Färbung der Schnitte 1 Stunde bei 37° im Thermostaten oder 24 Stunden bei Zimmertemperatur in Karbolfuchsin.
2) Differenzieren in salzsaurem 70-proz. Alkohol.
3) Färbung mit Hämatoxylin — van Gieson in der gewöhnlichen Art und Weise.
4) Alkohol — Xylol — Balsam.

Bazillen dunkelrot, Kerne blau, Protoplasma gelbbraun, Bindegewebe leuchtend rot.

B. 1) und 2) wie bei A.
3) Färbung 1 Stunde in Weigert's Farbflüssigkeit für elastische Fasern (s. S. 71).
4) Abspülen in 96-proz. Alkohol.
5) Nachfärbung in Lithionkarmin, Abspülen in salzsaurem Alkohol.
6) Alkohol — Xylol — Balsam.

Bazillen dunkelrot mit leichtem Stich ins Violette, elastische Fasern dunkelblau, übriges Gewebe hellrot mit etwas dunkleren Kernen.

Über gleichzeitige Elastin- und Tuberkelbazillenfärbung s. auch S. 72.

Der Fettgehalt der Tuberkelbazillen gestattet nach Dorset auch eine Färbung mit Sudan III. Deckglaspräparate kommen auf 5—10 Minuten in eine kalt gesäftigte Lösung in 80-proz. Alkohol, dann auf 5 Minuten in 70-proz. Alkohol. Schnitte werden ebenso behandelt, mit Methylenblau gegengefärbt, Alk. abs., Nelkenöl, Balsam.

Dieselbe Färbung wie der Tuberkelbacillus geben auch eine Reihe von anderen „säurefesten" Bazillen. In differentiell-diagnostischer Beziehung sind, vor allem bei Erkrankungen des Urogenitalapparates, am wichtigsten die

**Smegmabazillen.** Sie sind sehr verbreitet und finden sich namentlich an den weiblichen äußeren Genitalien, hier vor allem oft massenhaft in der Falte zwischen Labium majus und minus. Aber auch sonst werden sie in den Hautsekreten gefunden. Ihr morphologisches Verhalten ist sehr wechselnd und für die Unterscheidung von dem Tuberkelbacillus nicht ausschlaggebend. Sie sind oft kürzer und plumper wie dieser, manchmal aber auch fast identisch. Lagerung in Häufchen kommt auch bei den Smegmabazillen vor. Sie können sich, wenn auch recht selten, auch in dem durch den Katheter gewonnenen Harn finden. Es ist daher auch das Katheterisieren kein absolut sicheres Hilfsmittel bei fraglicher Urogenitaltuberkulose. Bei der Färbung haben die Smegmabazillen eine geringere Resistenzfähigkeit gegen die längere Einwirkung von Alkohol. Darauf beruhen folgende Färbungsverfahren, die eine Unterscheidung mit ziemlicher Sicherheit gestatten, das Impfexperiment aber doch in schwierigen Fällen nicht ganz überflüssig machen:

Färbung von Bunge und Trantenroth:

1) Fixieren der Deckglaspräparate direkt, unter Fortlassung der Flammenfixation, wenigstens 3 Stunden in absolutem Alkohol.
2) Übertragen für 15 Minuten in 3-proz. Chromsäure.
3) Sorgfältiges Auswaschen in mehrfach zu wechselndem Wasser.
4) Färben, 2 Minuten lang, unter Aufkochen in Karbolfuchsin.
5) Entfärben 3 Minuten lang in Acid. sulphuric. dilut. oder 1 bis 2 Minuten in Acid. nitric. pur.
6) Gegenfärbung in konz. alkoholischer Methylenblaulösung, wenigstens 5 Minuten lang. Auswaschen, Trocknen, Balsam. Nur die Tuberkelbazillen sind rot gefärbt.

Färbung von Pappenheim.

Dieselbe ist der Methode von Czaplewski (s. S. 125), die schon an und für sich meist zur Unterscheidung ausreicht, nachgebildet. Das Fluorescein ist durch Corallin ersetzt.

1) Färben 2 Minuten lang in kochendem Karbolfuchsin.
2) Ablaufenlassen der Farbe ohne Spülung.
3) Entfärbung und Gegenfärbung durch 3—9maliges Eintauchen und Ablaufenlassen in

   Corallin 1,0
   Alkohol absolut. 100,0 dazu
   Methylenblau bis zur vollständigen Sättigung
   Glyzerin 20,0
4) Kurzes Abspülen in Wasser, Trocknen, Balsam.

Die Smegmabazillen sind blau, die Tuberkelbazillen rot.

Färbung von Honsell.

1) Färben 2 Minuten lang, unter Kochen, in Karbolfuchsin.
2) Abspülen in Wasser, Trocknen.
3) Behandeln, 10 Minuten lang in Salzsäure 3,0 : 100 absolutem Alkohol.
4) Abspülen in Wasser.
5) Färben in einer Mischung von konz. alkoholischer Methylenblaulösung und Wasser āā.

Nur Tuberkelbazillen bleiben rot gefärbt.

Ob die Methoden auch für andere säurefeste Bazillen (Butter, Milch, Mist) ausreichen, bleibt abzuwarten.

**Leprabazillen.**

Sie sind den Tuberkelbazillen sehr ähnlich; sie gehören ebenfalls zu den säurefesten Bazillen und färben sich mit eben denselben Methoden und nach Gram. Ein Unterschied besteht darin, daß die Färbung schneller erfolgt, aber auch viel schneller, zuweilen schon nach Stunden, wieder schwindet. Auch die Methode von Gabbet liefert für Schnitte gute und ziemlich haltbare Präparate. Zum Unterschiede von den Tuberkelbazillen färben sich aber die Leprabazillen auch mit einfach wässerigen Lösungen.

Färbung nach Baumgarten.

1) Färbung 6—7 Minuten lang in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung (5 Tropfen konzentr. alkoholische Lösung auf ein Uhrschälchen mit Wasser).
2) Entfärben $^1/_4$ Minute lang in saurem Alkohol (Salpetersäure 1 : Alkohol 10).
3) Abwaschen in Wasser.
4) Nachfärbung in Methylenblau, Abwaschen in Wasser usw., Kanadabalsam.

Während die Leprabazillen so als rote Stäbchen auf blauem Grunde erscheinen, färben sich Tuberkelbazillen mit dem angegebenen Verfahren in der kurzen Zeit nicht.

Andererseits kann man nach Lustgarten zur differentiellen Diagnose zwischen Tuberkel- und Leprabazillen die Tatsache verwerten, daß die in Anilinwassergentianaviolett oder Anilinwasserfuchsin gefärbten Leprabazillen durch eine 1-proz. Lösung von unterchlorigsaurem Natron nicht so leicht entfärbt werden, wie Tuberkelbazillen.

**Aktinomycespilz.**

Wenn man Eiter auf Aktinomycespilze zu untersuchen hat, so sucht man in demselben nach den charakteristischen weißlichen Körnchen. Man breitet dazu den Eiter am besten auf einer Glasplatte aus und untersucht auf einer dunklen Unterlage. Wenn man Körnchen gefunden hat, so zerquetscht man sie vorsichtig zwischen Objektträger und Deckglas und findet dann bei der mikroskopischen Untersuchung ohne Mühe die eigentümlichen Rasen und birnförmigen Ausläufer oder Kolben.

Man kann natürlich auch Deckglastrockenpräparate herstellen und dieselben wie Schnitte färben.

Für die Untersuchung des Aktinomyces in Schnitten sind eine ganze Anzahl von Methoden angegeben worden, die indes meist an dem Übelstande leiden, daß sie nicht konstant gute Präparate geben, oft färben sich die verschiedenen Pilzrasen in ein und demselben Schnitte verschieden. Zum einfachen Nachweis in Schnitten genügen Doppelfärbungen mit Hämatoxylin und Karmin oder Eosin, durch welche die Drusen mit meist blaßblauem Zentrum und roter Peripherie in dem dunkelblauen Gewebe hinreichend deutlich hervortreten. Ebenso gute Präparate erhält man durch die VAN GIESON'sche Methode.

Sehr gute Präparate gibt die WEIGERT'sche Bakterienfärbung (s. S. 110) mit vorhergehender Lithionkarminfärbung. Die Differenzierung des Rasens ist hierbei so schön, wie bei keiner anderen Methode.

Sehr empfehlenswert sind die beiden folgenden Kombinationen mit WEIGERT'scher Färbung, da sie eine gute Differenzierung der Rasen gegenüber den Kolben geben, und auch die übrigen Gewebsbestandteile schön gefärbt werden.

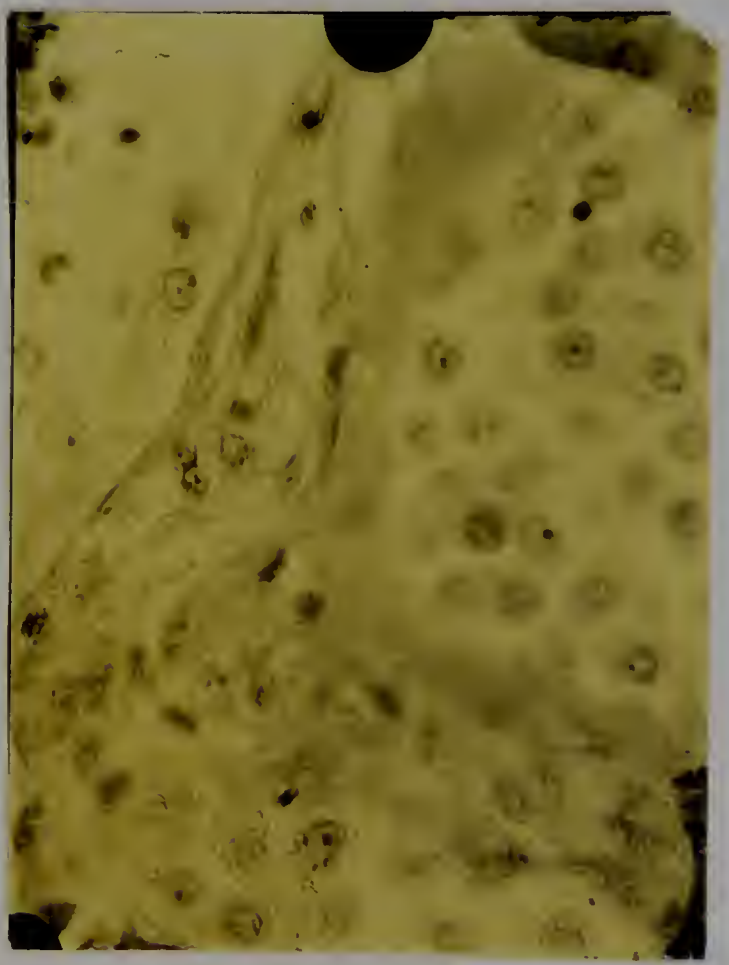
I. Deckglasfärbung.

1) Aufstreichen des Druseninhaltes auf ein Deckglas, Lufttrocknen, Durchziehen durch die Flamme.
2) Färben 24 Stunden lang in Anilinwassersafranin.
3) Kurzes Abspülen in Wasser.
4) Färben 5 Minuten lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
5) Kurzes Abspülen in 0,6-proz. Kochsalzlösung.
6) Trocknen zwischen Fließpapier.
7) Übertragen des Deckglases auf 2 Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300.
8) Trocknen zwischen Fließpapier.
9) Entfärben in häufiger gewechseltem Anilinöl, bis das Präparat keine Farbe mehr abgibt.
10) Entfernen des Anilinöls mit Xylol; Kanadabalsam.

Pilzrasen blau, Kolben braunrot; die Gentianaviolettfärbung ist immer an zweiter Stelle auszuführen.

II. Für Schnitte.

1) Färben 24—48 Stunden in Anilinwassersafranin.
2) Gründliches Auswaschen in Wasser.
3) Färben $^1/_2$—1 Minute in Hämatoxylin.
4) Gründliches Auswaschen in Wasser.
5) Färben $^1/_2$—3 Stunden in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
6) Abspülen in 0,6-proz. Kochsalzlösung.
7) Übertragen auf 2—5 Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300.
8) Trocknen auf dem Spatel oder Objektträger mit Fließpapier.
9) Entfärben in Anilinöl, bis der Schnitt keine Farbe mehr abgibt.
10) Färben in Anilinöleosin $^1/_2$ Stunde.
11) Entfernen des Anilinöls in Xylol; Kanadabalsam.



Pilzrasen dunkelblau, Kolben braunrot, Zellkerne violett, Protoplasma rosarot.

Die Gram'sche Methode, mit 24-stündiger Färbung, gibt ebenfalls gute Resultate, hat aber den Nachteil gegenüber der Weigert-schen, daß in dem absoluten Alkohol das Celloidin gelöst wird, und dann oft die Drusen zum Teil ausfallen.

Bostroem empfiehlt statt der Weigert'schen und Gram'schen Färbung folgendes Verfahren:

1) Färbung in Anilinwassergentianaviolett.
2) Direkte Übertragung, ohne vorheriges Abwaschen, in Weigert-sches Pikrokarmin.
3) Gründliches Abspülen in Wasser.
4) Übertragen in Alkohol; Ausziehen des Gentianavioletts, bis die Schnitte rotgelb sind.
5) Origanumöl — Balsam.

Der fädige Teil des Aktinomyceskornes erscheint blaß, die Keulen rot, das umliegende Gewebe rotgelb.

Durchschnitte durch einzelne Aktinomyceskörner gelingen gut, wenn man sie sorgfältig in Celloidin einbettet.

Weigert hat noch eine Färbung mit Orseille angegeben:

1) Färbung eine Stunde lang in einer dunkelroten Lösung von Orseille in

| | |
|---|---|
| Alkohol absolut. | 20,0 |
| Acid. acetic. | 5,0 |
| Aqua destillat. | 40,0 |

2) Abspülen in Alkohol.
3) Färbung in 1-proz. wässeriger Gentianaviolettlösung.
4) Auswaschen in Alkohol.
5) Kanadabalsam.

Die Kerne der Zellen werden dabei blauviolett, das Bindegewebe orange, die inneren Partien des Strahlenpilzes verwaschen blau, die Außenpartien rubinrot.

Die käufliche Orseille muß man vor der Lösung einige Tage an der Luft stehen lassen, damit das Ammoniak verdampft.

Nach Israel kann man durch mehrstündiges Färben der Schnitte in einer konzentrierten Lösung von Orcein in durch Essigsäure angesäuertem Wasser eine burgunderrote Färbung der Aktinomyceskolben erzielen.

Flormann empfiehlt das folgende Färbungsverfahren, welches im wesentlichen der Kühne'schen Modifikation der Gram'schen Methode entspricht:

1) 5 Minuten langes Färben in:

| | |
|---|---|
| konzentrierte alkohol. Methylviolettlösung | 1 Teil |
| Wasser | 2 Teile |
| 1-proz. wässerige Lösung von kohlensaurem Ammoniak | 2 „ |

2) 10 Minuten langes Auswaschen in reichlichem Wasser.
3) Übertragen in eine Jodjodkaliumlösung (1 : 2 : 300) für 5 Minuten.

4) Gründliches Auswaschen in Wasser.
5) Ausziehen der Farbe 20 Minuten lang in einmal zu wechselndem Fluoresceinalkohol (1 : 50).
6) Auswaschen des Fluoresceins in 95-proz. Alkohol.
7) Übertragen in Anilinöl für einige Minuten.
8) Lavendelöl.
9) Xylol; Kanadabalsam.

Der Pilzrasen erscheint dunkelblau und sehr schön differenziert; die Kolben zum Teil hellblau, zum Teil farblos.

Nach Benda erzielt man mit der Levaditi'schen Silbermethode (siehe Spirochaete pallida) gute Darstellung des Mycels.

## III. Vibrionen.

### Choleravibrionen.

Die Cholerabazillen färben sich namentlich gut in konzentrierten wässerigen Fuchsinlösungen. Man tut gut, die Farblösung 10 Minuten lang einwirken zu lassen. Nach Gram entfärben sie sich. Schnitte werden mit Fuchsinlösung oder Methylenblau gefärbt.

Färberisch verhalten sich die choleraähnlichen Vibrionen ebenso.

## IV. Spirillen und Spirochaeten.

### Rekurrensspirillen.

Zur Färbung der Rekurrensspirillen im Blut hat Günther ein Verfahren angegeben, welches bezweckt, das Hämoglobin der roten Blutkörperchen zu extrahieren und diesen die Färbbarkeit zu nehmen, damit die gefärbten Spirillen um so besser hervortreten.

1) Die Deckglaspräparate werden dreimal durch die Flamme gezogen, oder besser für 5 Minuten in den Thermostaten bei 75° gelegt.
2) 10 Sekunden langes Abspülen in 5-proz. Essigsäure.
3) Entfernen der Essigsäure, zuerst durch Wegblasen mittels einer Glasröhre, dann dadurch, daß man das Deckglas mehrere Sekunden lang mit der Präparatenseite nach unten über starke Ammoniaklösung hält.
4) Färben in wässerigen Lösungen von Anilinfarben.
5) Abspülen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Färbung der Rekurrensspirillen in Schnitten nach Nikiforoff:

1) Härtung 24 Stunden lang in einer Mischung von
Kali bichromicum, 5-proz. wässerige Lösung
Sublimat, gesättigte Lösung in 0,6-proz. Na-Cl-Lösung } gleiche Teile.
2) Nachhärtung in warmem Raume in 70—85—95-proz. Alkohol.
3) Paraffineinbettung.
4) Färbung 24 Stunden lang in einer Mischung von
Spirituöse 1-proz. Tropäolinlösung, 5 ccm.
Konzentrierte wässerige Methylenblaulösung, 10 ccm.
Ätzkalilösung (1 : 1000) 2 Tropfen.
5) Abspülen mit Wasser.

6) 2—3maliges Untertauchen in Alkohol absolut. und Äther zu gleichen Teilen.
7) Bergamottöl — Xylol.

Für Deckglastrockenpräparate eignet sich vorzüglich die GIEMSA'sche Färbung, für Schnittpräparate das Versilberungsverfahren von LEVADITI (siehe Spirochaete pallida).

Spirochaeten der Afrikanischen Recurrens erhalten sich färberisch wie die Spirochaete Obermeieri.

Die Spirochaeten bei PLAUT-VINCENT'scher Angina, bei Hühnerspirillose, die Spirochaete refringens und die bei ulcerösen Prozessen im Verdauungskanal angetroffenen Formen färben sich mit wässerigen Anilinfarben und mit Giemsafärbung. Im Schnitt lassen sie sich mit LEVADITI's Methode darstellen.

### Spirochaeta pallida (Treponema pallidum Schaudinn).

I. Untersuchung im lebenden Zustande.

Am bequemsten ist sie mit Dunkelfeldbeleuchtung aufzufinden. Im hängenden Tropfen leistet die Vitalfärbung nach MANDELBAUM (s. S. 99) gute Dienste.

II. Untersuchung im Ausstrich.

Das durch Abschaben, Reiben oder Quetschen nach Entfernung der obersten verunreinigten Lagen gewonnene Reizserum oder die Punktionsflüssigkeit wird in möglichst dünner Schicht auf Deckgläser ausgestrichen. Die Präparate läßt man an der Luft trocknen und fixiert 15—20 Minuten in absolutem Alkohol. Auch die bei Blutpräparaten (s. dort) angeführten Fixierungen in Osmium- oder Formalindämpfen kann man anwenden.

**Färbung nach GIEMSA.**

1) Von folgender Farblösung (fertig zu beziehen von Grübler)

| | |
|---|---|
| Azur II-Eosin | 3,0 g |
| Azur II | 0,8 „ |
| Glyzerin (Merck, chemisch rein) | 250,0 „ |
| Methylalkohol (Kahlbaum I) | 250,0 „ |

wird in einem weiten, peinlichst gesäuberten graduierten Mischzylinder von mindestens 3 cm Lichtung unter Umschwenken (stärkeres Schütteln ist zu vermeiden!) eine Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt (1 Tropfen auf etwa 1 ccm Wasser); die Farblösung läßt man am besten aus einer mit Alkohol absol. ausgespülten, stets verschlossen zu haltenden Tropfflasche zufließen.
2) Übergießen der Präparate ohne Verzug mit der eben verdünnten Lösung. Färbedauer 10—15 Minuten. Am besten nach 10 Minuten langer Einwirkung neue Farblösung aufgießen.
3) Abwaschen in scharfem Wasserstrahl.
4) Abtupfen mit Fließpapier, trocken werden lassen und Einbetten in Kanadabalsam.

Für einzelne Zwecke (z. B. um die Endgeißel hervortreten zu lassen) ist es vorteilhaft, dem Wasser, bevor man es mit dem Farbstoff mischt, etwas Kaliumcarbonat (1—10 Tropfen einer 1‰ Lösung) hin-

zuzufügen. Überfärbte Präparate lassen sieh in destilliertem Wasser (1—5 Minuten) sehr gut differenzieren.

Später hat Giemsa den Glyzeringehalt seiner Farblösung auf die Hälfte reduziert und das Fehlende dureh Methylalkohol ersetzt. Diese neue Lösung wird jetzt von Grübler, falls nicht ausdrüeklieh anderes verlangt wird als „Giemsa's Farblösung zur Erzielung der Romanowsky-Färbung" abgegeben und ist sowohl für die obige Methode verwendbar, wie auch für

**Giemsa's Schnellfärbemethode.**

1) Man stellt die Ausstriche auf dem Objektträger her. Ältere, gut ausgetroeknete Präparate brauchen nieht fixiert zu werden. Bei frischen dreimaliges, vorsiehtiges Durchziehen durch eine mittelstarke (nieht rauehende) Gasflamme oder durch eine Spiritusflamme. Oder Alkoholfixierung wie oben.
2) Färben
   a) Einklemmen des Ausstriehs in einen sauberen Objektträgerhalter nach Abel (zu haben bei Altmann, Berlin NW, Luisenstr. 47). Schichtseite naeh oben. Noch bequemer ist es, den Objektträger quer mit dem Diamanten zu ritzen und ohne die Sehicht mit den Fingern zu berühren, zu zerbrechen. Es genügt dann eine gewöhnliche Cornetpinzette zum Halten.
   b) Herstellung des frisehen wässerigen Farbgemisches (10 Tropfen der Stammlösung aus einem Tropffläschchen auf 10 ccm destilliertes säurefreies (!) Wasser) unter gelindem Umsehwenken bis zur gleichmäßigen Verteilung.
   c) Sofortiges Übergießen des Ausstrichs und Erwärmen (etwa 5 cm über der Flamme), bis schwache Dampfbildung auftritt. 1/4 Minute beiseite stellen; Farblösung abgießen. Ohne Verzug eine weitere Portion desselben Farbgemisches auf das noch feuchte Präparat gießen, wiederum erwärmen, 1/4 Minute beiseite stellen und diese Prozedur im ganzen etwa viermal ausführen, nur mit dem Unterschiede, daß man die Farblösung das letztemal 1 Minute lang auf den Ausstrich einwirken läßt.
3) Ganz kurzes Abwasehen mit der Spritzflasche oder — vorausgesetzt, daß das betr. Wasser sich dazu eignet — in sehwachem Strahl der Wasserleitung.
4) Troeknen.
   Man findet die Pallida am besten an solchen dünnen Stellen des Präparats, an denen sieh Erythrocyten mit größeren kernlosen, rein blau erseheinenden Gewebselementen durchsetzt vorfinden.

**Löffler's Schnellfärbung.**

1) Dünn ausgestrichene Präparate werden in Alkohol-Äther gut fixiert.
2) Auf das in einer Cornet'sehen Pinzette gehaltene Präparat bringt man 3 Tropfen einer 0,5-proz. Lösung von Natrium arsenieosum und 1 Tropfen einer 0,5-proz. Lösung von Malachit-

grünkristalle-Chlorzinkdoppelsalz, erwärmt bis zur Dampfbildung und färbt 1 Minute. Darauf spült man mit kräftigem Wasserstrahl ab.

3) In ein Reagenzglas bringt man 5 ccm einer 0,5-proz. Lösung von reinem Glyzerin und läßt dazu tropfen aus einer Tropfflasche 5—10 Tropfen der Giemsa-Lösung. Die Flüssigkeit wird darauf über der Flamme zum Sieden erhitzt und heiß auf das Deckglas aufgegossen. Auf demselben bleibt sie 1—5 Minuten stehen, dann wird sie abgegossen und das Präparat kräftig mit dem Wasserstrahl abgespült. (Die Glyzerin-Giemsa-Lösung kann wiederholt aufgekocht und verwendet werden.)

Nach Schmorl ist es oft vorteilhaft, besonders bei Neugeborenen mit congenitaler Syphilis die Ausstrichpräparate von Organen nach Formalinfixierung anzufertigen. Man findet dabei oft reichlichere und intensiver gefärbte Spirochaeten als in Ausstrichen von den frischen Organen.

Die zahlreichen sonstigen zur Färbung der Spirochaete pallida im Ausstrich angegebenen Verfahren bieten den beschriebenen gegenüber keine Vorteile.

### III. Schnittpräparate.

**Alte Methode von Levaditi.**

1) Fixierung dünner Gewebsscheiben für 24 Stunden oder länger in 10-proz. Formalinlösung. (Formol-Müller und Alkoholhärtung auch brauchbar.)
2) 24 Stunden in 96-proz. Alkohol.
3) Einlegen in destilliertes Wasser, bis die Stücke untersinken.
4) 3 Tage lange Imprägnation im Brutofen mit 1,5-proz. Argentum nitricum-Lösung.
5) Kurzes Auswaschen in Wasser.
6) Reduktion 48 Stunden bei Zimmertemperatur in

| | |
|---|---|
| Pyrogallussäure | 4 g |
| Formalin (40-proz.) | 5 ccm |
| Aqua destill. | 100 „ |

In dunkler Flasche vor Licht schützen!

7) Auswaschen in Wasser. Gefrierschnitte, Celloidin- oder Paraffineinbettung. In den peripheren Schichten sind meist Silberniederschläge.

**Neue Methode von Levaditi.** Die Dauer ist bedeutend geringer; ich ziehe aber die ältere Methode als sicherer vor.

1—3) wie oben.
4) Imprägnation in 96 ccm einer 1,5-proz. Silbernitratlösung, der unmittelbar vor dem Gebrauch 10 ccm reinstes Pyridin zugesetzt werden. Die an Zwirnsfäden aufgehängten Stücke bleiben in dieser Lösung in dunkler Flasche 2—3 Stunden bei Zimmertemperatur und werden dann 4—6 Stunden bei 50° gehalten.
5) Rasches Abwaschen in reinem Pyridin.
6) Reduktion. Zu 85 ccm eines frisch bereiteten Gemisches von 90 ccm 4-proz. Pyrogallussäurelösung und 10 ccm reinstem Aceton setzt man 15 ccm Pyridin hinzu. Die Stücke bleiben in dieser Lösung etwa 12 Stunden in dunkler Flasche.
7) Übertragen in Alkohol und rasche Einbettung in Paraffin.

Auch von Präparaten in Kaiserling'scher Lösung lassen sich nach gründlichem Auswässern Spirochaetenschnitte nach Levaditi herstellen. Am Knochen kann man nach Entkalkung in salpetersaurem Alkohol die Imprägnation ausführen.

Will man noch eine Kernfärbung hinzufügen, so kann man mit Toluidinblau oder Safranin nachfärben. Versé empfiehlt am meisten 1-proz. Jodgrünlösung; kurzes Abspülen der überfärbten Präparate in Wasser, ganz kurzes Eintauchen in 75-proz. Alkohol, kurze Entwässerung in Aceton, kurzes Aufhellen in dem ebenfalls etwas entfärbenden Nelken- oder Origanumöl.

Um die Präparate gut mit den gewöhnlichen Kern- und Protoplasmafärbungen darstellen zu können, muß man sie vom Silber befreien, allerdings auch unter Verlust der Spirochaetenimprägnation. Man erreicht dies nach Versé durch

1) kurze Behandlung in kognakbrauner Jodjodkalilösung und Differenzierung in 20—25-proz. Natriumthiosulfatlösung oder
2) 10-proz. Ferrocyankalilösung und nachfolgende Behandlung mit Natriumthiosulfat oder
3) Konzentrierte Sublimatlösung.

Bei allen Methoden gründliches Auswaschen.

Giemsafärbung im Schnitt nach Schmorl.

1) Fixierung in 4-proz. Formol. Möglichst dünne Gefrierschnitte von nicht ausgewässertem Material. Auffangen in destilliertem Wasser oder Formalin.
2) Man bringt in eine ganz saubere Schale eine bestimmte Menge destilliertes Wasser, überträgt in dieses die Schnitte mit gut gereinigter, am besten frisch ausgeglühter Glasnadel und tropft nun erst die nötige Menge Giemsalösung (1 Tropfen auf 1 ccm Wasser) hinzu. Durch vorsichtiges Umschwenken verteilt man den Farbstoff gleichmäßig und breitet die Schnitte mit Glasnadeln aus. Nach 1 Stunde bringt man die Schnitte in eine frisch hergestellte Lösung, in der man sie 5—12—24 Stunden läßt.
3) Nach kurzem Abspülen oder direkt Übertragen in eine konzentrierte Lösung von Kalialaun.
4) Kurzes Abspülen in Wasser und entweder
5a) Einschluß in Glyzeringelatine oder
5b) Auffangen auf dem Objektträger — Abtrocknen — nahezu vollkommen trocken werden lassen — (Alkohol muß völlig vermieden werden!) — Xylol — Kanadabalsam oder besser Zedernholzöl.

Bei 5b kann auch Behandlung in Kalialaun (3) fortgelassen werden.

Die bei Lungengangrän öfters gefundene, der Pallida außerordentlich ähnliche Spirochaete läßt sich ebenfalls mit der Versilberung nach Levaditi darstellen.

---

## Zwölftes Kapitel.

# Untersuchung von Schimmel- und Sprosspilzen.

Zur Untersuchung der beim Menschen vorkommenden Fadenpilze werden die von den Pilzen durchwachsenen Gewebe in Wasser oder 0,6-proz. Kochsalzlösung zerzupft; meist gelingt es auf diese Weise

schon, sich die einzelnen Bestandteile der Pilze zur Anschauung zu bringen. Sind die betreffenden Gewebe wenig durchsichtig, so kann man sie durch Anwendung einer 1—3-proz. Kali- oder Natronlauge aufhellen. Glyzerin und Alkohol verursachen eine erhebliche Schrumpfung der Pilzfäden.

Ganz besonders empfiehlt sich nach C. Fraenkel Zerzupfen in 50-proz. Alkohol, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt sind. Man überträgt dann das möglichst fein zerzupfte Material zur mikroskopischen Untersuchung in Glyzerin, in welchem man die Pilze nach Wachsumrandung und Umziehen mit Lack auch als Dauerpräparate konservieren kann. Zur Härtung von Gewebsteilen, die mit Fadenpilzen durchwachsen sind, benutzt man gewöhnlich absoluten Alkohol, um ein postmortales Auswachsen möglichst bald und sicher zu verhindern, ebenso ist Formalin anwendbar. In Müller'scher Flüssigkeit ist die Schrumpfung geringer. Zur Färbung eignet sich am besten Vesuvin und Methylenblau, doch verhalten sich die verschiedenen Spezies gegen die einzelnen Anilinfarben verschieden. Gute Resultate gibt die Romanowsky-Ziemann'sche Färbung (s. S. 151).

Aspergillus färbt sich mit Fuchsin, Methylviolett und Vesuvin.

Die Darstellung der **epiphytischen Bakterien,** die sich auf der Haut befinden, erfordert eine besondere Technik, weil die Hornsubstanzen eine ähnliche Affinität zu den basischen Anilinfarben besitzen, wie die Bakterien, und daher leicht zu stark mitgefärbt, resp. zu wenig entfärbt werden, oder gleichzeitig eine zu starke Entfärbung der Bakterien eintritt.

Vor der Färbung müssen die Hautschuppen entfettet werden. Man kann dabei in verschiedener Weise verfahren.

1) Man entfettet die mit den Pilzen behafteten Haare, Schuppen usw. zuerst mit Alkohol und Äther. Danach werden sie einige Sekunden mit wässeriger oder alkoholischer Lösung von Eosin oder in anderen Anilinfarben gefärbt, und dann nach Entwässerung in Alkohol in Kanadabalsam eingelegt. Will man die Präparate nicht konservieren, so untersucht man in 33-proz. Kalilauge.

2) Man entfettet die Schüppchen oder die Haut in Alkohol und Äther, färbt sie in Anilinfuchsin, wäscht sie in salzsaurem Alkohol aus, entwässert in Alkohol und untersucht in Kanadabalsam. Man kann auch eine Doppelfärbung mit Gentianaviolett anfügen.

3) Man tupft nach Bizzozero Deckgläser auf die zu untersuchende Stelle der Oberhaut, zieht dann die Deckgläser dreimal durch die Flamme und entfettet nun in Alkohol und Äther.

Alsdann wird mit einer Anilinfarbe gefärbt.

3a) Man bringt die entfetteten Deckgläschen aus dem Alkohol in einen Tropfen 50-proz. Essigsäure oder 10-proz. Kalilauge; nachdem die Schüppchen aufgequollen sind, untersucht man; noch empfehlenswerter ist es oft, die Schnüppchen auf dem Deckglas in Essigsäure aufquellen zu lassen, die Essigsäure zu verdampfen und nun das Präparat wie ein Deckglastrockenpräparat zu behandeln und mit Löffler'schem Methylenblau zu färben.

4) Man kann die Schüppchen auch in Glyzerin untersuchen, welches durch Methylenblau gefärbt ist. Die Bakterien nehmen eine blaue Farbe an.

Boeck hat zum Nachweis von Schimmelpilzen in Epidermisschüppchen folgendes Verfahren angegeben:

1) Entfettung der Schüppchen in Alkohol und Äther.
2) Färbung $^1/_2$ bis einige Minuten lang in
   Sahli's Methylenblaulösung =
   5-proz. wässerige Boraxlösung 16 Teile
   konzentrierte wässerige Methylenblaulösung 20 „
   Wasser 24 „
3) Übertragen für $^1/_2$—1 Minute in schwache wässerige Resorcinlösung (einige Körnchen Resorcin in einer Uhrschale mit Wasser.
4) Übertragen in Alkohol einige Minuten bis 1 Stunde.
5) Entfärbung in schwacher Lösung von Wasserstoffsuperoxyd. (Diese Entfärbung ist nicht immer, aber oft nötig.)
6) Alkohol. Xylol. Kanadabalsam.

Unna (Monatsschr. f. praktische Dermatol XIII, No. 6 und 7) empfiehlt folgendes Verfahren zum Nachweis von Bakterien: Man zerreibt die mit einem Tropfen Eisessig angefeuchteten Hautschuppen zwischen zwei Objektträgern zu einem Brei, trocknet die voneinander abgehobenen Objektträger rasch über der Flamme und gießt dann auf die schräg gehaltenen Objektträger Alkohol-Äther zur Entfernung des Fettes. Färben mit Borax-Methylenblau, Abspülen mit Wasser. Will man stärker entfärben, so wendet man eines der von Unna a. a. O. empfohlenen Reagentien an.

Die verschiedenen **Hefearten,** wie sie sich namentlich im Magen finden, färbt man am besten nach der Deckglastrockenmethode mit dünner Bismarckbraunlösung, da sie sich mit den übrigen Anilinfarben sehr leicht überfärben. Auch Lebendfärbung mit dünner Methylenblaulösung gibt oft gute Resultate. Schöne Färbungen werden auch nach der Methode von Romanowsky-Ziemann erzielt (s. S. 151).

Der **Soorpilz** färbt sich gut nach der Gram'schen (s. S. 102, 110) oder Weigert'schen (s. S. 110) Bakterienfärbung. Vorfärbung der Schnitte in Lithionkarmin ist zu empfehlen.

Für Sarcina ventriculi ist wegen der leichten Überfärbung verdünnte Bismarckbraunlösung angebracht.

Für Schnitte Vorfärbung in Hämalaun und Nachfärbung (2 bis 3 Minuten) in sehr verdünnter Karbolfuchsinlösung (Kerne blaurot, Hefen rot).

---

Dreizehntes Kapitel.

# Untersuchung der tierischen Parasiten.

## I. Vermes und Arthrozoen.

Die Untersuchung der tierischen Parasiten bietet, sofern es sich nicht um eingehendere Untersuchung ihres Baues handelt, keine Schwierigkeiten. Viele, z. B. Acarus scabiei, Acarus folliculorum, Oxyuris vermicularis, Trichocephalus dispar, Anchylostomum duodenale, Trichina spiralis, Distoma hepaticum und lanceolatum, können ohne

weiteres in Wasser untersucht werden. Häufig ist es dabei von Vorteil, durch einen mäßigen, mit dem Stiel einer Präpariernadel ausgeübten Druck auf das Deckgläschen das betreffende Tier platt zu drücken. Die Eier der Nematoden, Trematoden und Cestoden werden ebenfalls in Wasser untersucht.

**Muskeltrichinen** können in Zerzupfungspräparaten untersucht werden; ein sehr schnell zu bewerkstelligendes Verfahren besteht darin, daß man kleine Partikelchen Fleisch zwischen zwei Objektträgern zu einem durchsichtigen Brei zerquetscht und dann mit schwacher oder mittlerer Vergrößerung untersucht.

Man wählt zur Untersuchung namentlich Stücke vom Zwerchfell und von der Kiefermuskulatur, und zwar vorzugsweise Stückchen aus den der Sehne benachbarten Teilen des Muskels.

Auch Schnittpräparate kann man auf Trichinen untersuchen. Man schneidet entweder direkt oder nach vorheriger Celloidineinbettung auf dem Gefriermikrotom. Die Schnitte dürfen nicht zu dünn gemacht werden; dickere Schnitte kann man mit wässerigen Lösungen von Methylgrün (1 : 30) färben. Die Trichinenkapseln treten dann besser hervor. Hämatoxylin-Eosin gibt eine gute Färbung.

Eingekapselte und verkalkte Trichinen kann man durch Säurezusatz durchsichtig machen.

Die Köpfe der **Bandwürmer** betrachtet man mit schwacher und mittelstarker Vergrößerung in Wasser oder Kochsalzlösung oder Glyzerin. Echinococcusscolices kann man mit einem Skalpell von der Wand der Blasen abschaben und in Wasser oder verdünntem Glyzerin untersuchen. Die spornförmigen Haken sind oft noch in Zerzupfungspräparaten von abgestorbenen und verkalkten Echinokokken nachweisbar.

Den Skolex des Cysticercus cellulosae kann man sich durch Zerreißen der Blase frei machen. Danach wird er zur Untersuchung des Hakenkranzes und der Saugnäpfe unter dem Deckglas zerquetscht. Durch Kompression eines frischen reifen Bandwurmgliedes zwischen zwei Objektträgern kann man sich auch die Verzweigung des mit Eiern gefüllten Uterus zur Anschauung bringen.

Durchschnitte durch die Wand einer Echinococcusblase, mit einem Rasiermesser oder auch nur mit einer Schere ausgeführt und in Wasser untersucht, zeigen sehr deutlich die Schichtung der Cuticularmasse.

Außerdem kann man das **Chitin** mikrochemisch durch Jodjodkalilösung und Chlorzink nachweisen. Man bringt das zu untersuchende Objekt mit Wasser unter das Deckglas, läßt vom Rande her einen Tropfen Jodjodkalilösung zufließen, saugt diesen teilweise wieder ab, setzt einen Tropfen konzentrierte Chlorzinklösung zu und entfernt auch dieses unter Zusatz von Wasser wieder. Das Chitin färbt sich dann in seiner inneren Schicht violett, in der äußeren meist braun.

Zur Aufbewahrung und Härtung wird gewöhnlich Spiritus benutzt. In Müller'scher Flüssigkeit werden die Blasen leicht spröde. Wenn die einzelnen Teile bei Anlegung von Schnitten auseinanderfallen, so wendet man Celloidineinbettung an. Zur Färbung benutzt man kernfärbende Farben allein oder zusammen mit Eosin oder Karmin.

Die mikroskopischen Präparate können sowohl in Glyzerin wie in Kanadabalsam aufgehoben werden. Ersteres ist namentlich bei ungefärbten Präparaten zu empfehlen.

**II. Protozoen**[1]). Bei der Untersuchung lebender Protozoen benutzt man oft mit Vorteil einen heizbaren Objekttisch und die Vitalfärbung mit Bismarckbraun (1 : 3000), Methylenblau rectificatum (1 : 20,000 bis 1 : 100,000) mit tagelanger Einwirkung, Brillant-Kresylblau, Neutralrot, Nilblausulfat u. a. Man kann im Gegensatz zu den Metazoenkernen auch die lebenden Kerne gefärbt erhalten, und trotzdem unter Umständen, z. B. mit Neutralrot, den Teilungsprozeß verlaufen sehen. Ferner färben sich Granulationen, Verdauungsvakuolen usw. Das Chromatin ist nicht stets an einen umschriebenen Kern gebunden, sondern oft in der Zelle als Chromodien verstreut. Das Chromatin läßt sich mit Methylgrünessigsäure (starke wässerige Lösung mit 1-proz. Essigsäure) färben. Mit der Romanowski- oder Giemsa-Methode wird Chromatin rot, Plastinsubstanzen blau.

Für **Amoeben** empfiehlt sich vor allem frische Untersuchung in ihrer natürlichen Aufenthaltsflüssigkeit. Bei Untersuchung auf Beweglichkeit muß man physikalische (Druck, Eintrocknen) und chemische Schädlichkeiten vermeiden. Zu rasche Bewegung kann man mechanisch durch Zusatz von Kirschgummilösung verlangsamen.

Ausstrichpräparate mit Dysenterieamoeben behandelt man am besten so, daß man den Schleim möglichst dünn ausstreicht und das Deckgläschen, ohne daß es eintrocknet auf ein heißes Sublimatgemisch fallen läßt (konzentrierte wässerige Sublimatlösung 100 ccm, Alkohol absol. 50 ccm, ev. Zusatz von Eisessig 5 ccm). Nach $^1/_4$stündiger Einwirkung Auswaschen in Wasser, Entfernen des Sublimats in leicht gelbem 60-proz. Jodjodalkohol, Färben in Delafield's Hämatoxylin, Wasser, Alkohol, Xylol, Balsam. Man kann die feuchten Ausstriche auch in Osmiumdämpfen fixieren. Die Färbung kann auch mit Safranin, Vesuvin oder Toluidinblau vorgenommen werden.

Zur Untersuchung der Parasiten in Schnitten empfiehlt sich, wenn dieselben nicht in festem, sondern in einem flüssigen Substrat enthalten sind, am meisten die von Biondi für die Untersuchung des Blutes in Schnitten (s. S. 155) angegebene Methode. Gewebe fixiert man in obiger Sublimatlösung, in Flemming'scher oder Zenker'scher Flüssigkeit. Zur Färbung hat sich außer den gewöhnlichen Kernfärbungsmitteln und den Anilinfarben mehrfach auch die Altmann'sche Methode zur Darstellung der Zellgranula bewährt. Die Anwendung der Kernfärbungsmittel kombiniert man am besten mit Eosinfärbung. Nach Härtung in Flemming'schem Gemisch auch Safraninfärbung. Auch die Hämatoxylineisenlackmethode von Heidenhain gibt oft gute Bilder. Harris empfiehlt an Präparaten, die in Alkohol oder Sublimat gehärtet sind, vorheriges Färben in Eosin und Nachfärben in schwacher Toluidinblaulösung; dann 3—4 Minuten langes Auswaschen in Alkohol. Zur Aufhellung soll Zedernholzöl oder Xylol benutzt werden.

Zur Färbung der **Amoeba coli** in Schnitten empfiehlt Mallory folgendes Verfahren:

1) Härtung in Alkohol.

---

[1]) Als Spezialwerk zu empfehlen: Doflein, Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger. Jena 1901. — v. Prowazek, Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung. Leipzig 1907.

2) Färben der Schnitte 5—20 Minuten lang in gesättigter wässeriger Thioninlösung.
3) Auswaschen in Wasser.
4) Differenzieren $^1/_2$—1 Minute lang in 2-proz. wässeriger Oxalsäurelösung.
5) Auswaschen in Wasser.
6) Entwässern in 95-proz. Spiritus und absol. Alkohol.
7) (Aufhellen in Origanum- oder Bergamottöl für Celloidinschnitte.)
8) Auswaschen in Xylol.
9) Xylolkanadabalsam.

Amoebenkerne braunrot, alle anderen Kerne blau, Granulation der Mastzellen braun.

Auch die Mastzellenfärbung von Unna mit polychromem Methylenblau (s. S. 157), sowie die Methoden von Romanowsky-Ziemann (s. S. 151) und Giemsa (s. S. 131) werden empfohlen.

**Trypanosomen.** Zur lebenden Untersuchung bringt man einen Tropfen Blut oder Flüssigkeit auf den Objektträger und bedeckt ihn vorsichtig mit einem Deckglas. Auch Vitalfärbung ist anwendbar. Bei Umrandung des Deckglases kann man die Untersuchung längere Zeit fortsetzen.

Deckglasausstriche werden nach Lufttrocknung 15—30 Minuten in absolutem Alkhol oder feucht in Osmiumdämpfen fixiert. Färbung nach Giemsa (s. S. 131). Laveran macht die Färbung besser haltbar, durch Behandlung der Präparate nach dem Färben in 5-proz. wässeriger Tanninlösung. Auch mit Löffler's (s. S. 132) und Leishman's Methode (s. S. 154) werden gute Präparate erhalten.

Für Schnittfärbungen konserviert Halberstaedter für 12—24 Stunden kleine Organstücke in konzentrierter wässeriger Sublimatlösung. Dann 24 Stunden Auswässern in fließendem Wasser, Alkoholreihe, Paraffin. Färben 10 Minuten in polychromem Methylenblau. Abspülen in Wasser. Einige Sekunden absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Auch mit der Giemsaschnittfärbung von Schridde (s. S. 156) oder der Methode von Zieler (s. S. 156) oder Sternberg (s. S. 156) kann gefärbt werden.

**Malariaplasmodien.**

Das frische Blut untersucht Plehn in der Art, daß er auf den Objektträger sowohl, wie auf das Deckglas einen Tropfen flüssiges Paraffin bringt. Der Blutstropfen wird direkt auf dem Paraffintropfen des Deckgläschens aufgefangen und letzteres dann auf den Objektträger so aufgesetzt, daß sich das Blut zwischen den beiden Paraffinlagen befindet. Die Untersuchung geschieht auf heizbarem Objekttisch. Man kann aber auch einfach einen kleinen Blutstropfen vorsichtig mit einem Deckglas bedecken und umranden. Vitalfärbungen sind anwendbar, bieten aber keine besonderen Vorteile. Ausstrichpräparate streicht man mit der Kante eines Deckgläschens (s. Blut) möglichst dünn auf einem entfetteten Objektträger aus und läßt das Präparat lufttrocken werden. Fixierung 10—15 Minuten in Alkohol absolutus oder Alkohol-Äther.

Zur raschen Diagnosenstellung dient Manson's Färbung. In 100 ccm kochendem Wasser werden 5 g Borax und 2 g Methylenblau med. pur. Höchst gelöst. Diese Stammlösung wird so stark verdünnt, daß das

Licht durch eine 1 cm dicke Schicht gerade durchscheint. Färbung 10—15 Sekunden, bis das Präparat grünlichblau ist. Man erhält so aber meist nur gute Färbungen bei frischen Präparaten oder solchen, die nicht älter als 4 Wochen sind. Alte Präparate müssen mit einer 1-proz. Methylenblaulösung (+ 0,2-proz. Soda) vorsichtig einige Sekunden lang gefärbt werden. Der Ausfall der Färbung ist aber nicht sicher berechenbar.

Pleihn färbt 5—6 Minuten lang in einer frisch filtrierten Lösung von

| | | |
|---|---|---|
| Methylenblau, konzentrierte wässerige Lösung | 60,0 | |
| Eosin, $^1/_2$-proz. Lösung in 75-proz. Spiritus | 20,0 | |
| Destilliertes Wasser | 20,0 | |
| 20-proz. Kalilauge | 12 | Tropfen |

Abspülen in Wasser, Trocknen, Balsam.

Die besten Bilder der Strukturverhältnisse erhält man mit der ursprünglich für Malariaparasiten angegebenen Methode von Romanowsky-Ziemann (s. S. 151) und der Giemsa'schen Färbung (s. S. 131).

Zur Erleichterung der Malariadiagnose besonders bei spärlichem Vorhandensein von Parasiten dienen Methoden, die an sehr dicken Blutpräparaten vor oder während der Fixierung das Hämoglobin extrahieren. Natürlich sind solche Präparate für das feinere Studium der Malariaplasmodien nicht geeignet. Nach Ruge (Deutsche medizinische Wochenschrift 1903, Nr. 12) streicht man einen recht großen Blutstropfen auf ein gewöhnliches Deckglas aus und fixiert das lufttrockene Präparat in 2-proz. Formalin, dem $^1/_2$—1-proz. Essigsäure zugesetzt ist; in wenigen Minuten ist das Hämoglobin ausgezogen und die Blutschicht fixiert. Färbung in verdünnter Manson'scher Lösung (5-proz. Borax, 2-proz. wässerige Methylenblaulösung; die Lösung ist nur 6 Wochen haltbar) oder nach Romanowsky, ev. mit Nachfärben in verdünnter Manson'scher Lösung.

Bei nasser Konservierung werden die Kernstrukturen besser erhalten. Man verfährt so, wie oben für Ausstrichpräparate von Dysenterieamöben angegeben. Oder man läßt nach Schaudinn einige Tropfen Blut in ein Zentrifugiergläschen mit Hermann'scher Flüssigkeit (1-proz. Platinchhlorid 15 Teile, 2-proz. Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil) fallen, zentrifugiert; wäscht mit destilliertem Wasser aus, setzt einige Tropfen Delafield's Hämatoxylin hinzu und untersucht entweder in Wasser, Glyzerin oder Kali aceticum (gut für achromatische Strukturen) oder man bringt das Blut durch steigenden Alkohol in Xylol und Zedernöl.

Zur Fixierung von Gewebsstücken und Untersuchung in Schnitten verfährt man nach Bignami in folgender Weise:

1) Fixierung $^1/_2$ bis mehrere Stunden lang in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Sublimat | 1,0 |
| Chlornatrium | 0,75 |
| Essigsäure | 0,5—1,0 |
| Wasser | 100,0 |

2) Übertragung in Alkohol, dem etwas Jodtinktur zugesetzt ist.

3) Absoluter Alkohol.

Zum Färben dient Magentarot (v. Dr. Grübler, Leipzig), in gesättigter wässeriger Lösung oder in Karbolwasser gelöst, und nachfolgendes Auswaschen in absolutem Alkohol.

Zu Doppelfärbungen eignet sich eine Mischung von Magentarot und Aurantia in gesättigter alkoholischer Lösung.

Auch Hämatoxylin-Eosin, Eisenhämatoxylin, die Methoden von Sternberg (s. S. 156), Schridde (s. S. 156), Zieler (s. S. 156) geben gute Färbungen.

Für **Piroplasmen** gelten dieselben Vorschriften wie für Malariaplasmódien und Trypanosomen.

**Coccidien** werden frisch in ihrem natürlichen Medium oder in physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Für Deckglasausstriche ist die feuchte Fixierung (s. Dysenterieamöben) zu empfehlen. Gewebe fixiert man in Sublimatalkohol (s. S. 138) mit Eisessigzusatz, in Flemming'scher (s. S. 19) oder Hermann'scher (s. S. 140) Flüssigkeit. Färbung mit Gentianaviolett und Vesuvin. Empfehlenswert ist außerdem Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin, wobei man das Eosin in ziemlich starker Lösung und mehrere Stunden einwirken läßt. Auch Heidenhains Eisenhämatoxylin (s. S. 52) mit Bordeauxrotnachfärbung gibt gute Bilder. Glykogenfärbungen nach Alkoholhärtung und Fettfärbung an Gefrierschnitten nach Formolfixierung sind sehr instruktiv.

**Sarkosporidien** (Miescher'sche Schläuche). Ausstriche der Sporen kann man nach Alkoholfixierung mit Gentianaviolett oder nach Giemsa färben. Sarkosporidienhaltige Muskeln fixiert man in Sublimatalkohol, Flemming'scher oder Müller'scher Flüssigkeit. Färben mit Hämatoxylin-Eosin oder Nicolle's Karbolthionin (s. S. 101).

**Ciliaten.** Bei einzelnen Exemplaren kann man die Fixierungsflüssigkeit unter dem Deckglas hindurchsaugen, bei zahlreichen kann man zentrifugieren, auswaschen und das Sediment färben. Fixierung in Sublimatlösungen oder Osmiumgemischen. Schnittpräparate werden in Alaunkarmin oder Heidenhain'schem Eisenhämatoxylin, Hämatoxylin-Eosin oder van Gieson gefärbt. Die Cilien kann man an feuchten Deckglaspräparaten darstellen, indem man mit Löffler's Geißelbeize mindestens $^1/_2$ Stunde beizt und ebensolange mit Anilinwasser-Fuchsin färbt. Abspülen in Wasser, steigender Alkohol, Xylol, Balsam. Im Gegensatz zu der Bakteriengeißelfärbung dürfen die Präparate niemals trocken werden.

## Anhang.

Die Vaccinekörperchen (Guarneri'sche Körperchen) sollen hier kurz berührt werden, obwohl sie wahrscheinlich keine Parasiten, sondern degenerative Zellprodukte darstellen. Fixierung in Flemming'scher Flüssigkeit oder Sublimatkochsalzlösung. Celloidin- oder Paraffineinbettung. Färbung mit Heidenhain's Eisenhämatoxylin (Körperchen schwarz), Jodgrün-Fuchsin (Köperchen rot, Kerne blau), Safranin-Gentiana-Orange, oder Biondi'schem Gemisch (s. S. 57) (Körperchen blau, Leukocytenkerne und Mitosen grün, Kerne des Epithels und Bindegewebes blau, Protoplasma und Bindegewebe rot). Näheres siehe Hückel, Die Vaccinekörperchen, Ziegler's Beiträge, II. Supplementheft 1898.

Die Negri'schen Körperchen sind wahrscheinlich ebenfalls keine Parasiten, haben aber eine große diagnostische Bedeutung für Lyssa. Sie finden sich am reichlichsten im Ammonshorn. Im frischen Präparat sind sie nur außerordentlich schwer zu sehen. Man kann Ausstrich- oder Abklatschpräparate herstellen, nach Lufttrocknung in Methylalkohol oder Zenker'scher

Flüssigkeit fixieren und nach Giemsa (S. 131) färben. Nach van Gieson zerquetscht man ein etwa halberbsengroßes Stückchen Nervensubstanz mit sanftem Druck und zieht das Deckgläschen ab. Nach Fixierung einige Sekunden lang in Methylalkohol, wird mit folgender Farblösung bis zur Dampfbildung erwärmt (2 Tropfen gesättigte alkoholische Lösung von Rosanilinviolett + 1 Tropfen wässerige Methylenblaulösung + 10 ccm destilliertes Wasser, immer frisch bereiten!). Abspülen in Wasser, Trocknen, Balsam.

Am sichersten sind Schnittpräparate. Durch Formalinhärtung, Gefrierschnitte und die Romanowskyschnittmethoden (Sternberg, Schridde, Zieler) kann man in wenig Stunden Präparate haben. Meist wird Paraffineinbettung, eventuell mit der Henke-Zeller'schen Schnellmethode angewandt, nach Fixierung in Sublimatalkohol mit Essigsäurezusatz, Zenker'scher Flüssigkeit, Osmiumsäure oder Aceton.

Färbung nach Mann.

1) Färbung wenige Minuten bis 24 Stunden in einer Mischung von 35 ccm 1-proz. wässeriger Methylenblaulösung, 35 ccm 1-proz. wässeriger Eosinlösung und 100 ccm destilliertem Wasser.
2) Kurzes Abspülen in Wasser, dann in Alkohol absolutus.
3) Übertragen in eine Mischung von Alkohol absolutus 30,0 ccm und 5 Tropfen einer 1-proz. Lösung von Natronlauge in absolutem Alkohol für 15—20 Sekunden.
4) Abspülen in absolutem Alkohol und Wasser, je 1 Minute.
5) Für 2 Minuten in mit Essigsäure leicht angesäuertes Wasser.
6) Schnelle Entwässerung in Alkohol. Xylol. Balsam. Negri'sche Körperchen leuchtend rot. Zellen blau. Kernkörperchen rot.

Auch mehrere Tage in Glyzerin aufbewahrtes Material läßt sich noch auf diese Weise färben. Da dabei die Infektiosität des Materials nicht verloren geht, so ist die Einsendung in Glyzerin an die Untersuchungsanstalten empfehlenswert.

Besondere Strukturen lassen sich mit Ehrlich's saurem Hämatoxylin, Heidenhain's Hämatoxylin, der Bielschowsky'schen Silberimprägnation und anderen Methoden darstellen (s. Frosch, Kolle-Wassermann's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. I. Ergänzungsband).

---

Vierzehntes Kapitel.

# Übersicht über die Behandlung der einzelnen Gewebe und Organe zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung.

## Untersuchung des Blutes.

Die Untersuchung des Blutes kann vorgenommen werden

I. am frischen Präparat, mit oder ohne Zusatz von sog. Konservierungsflüssigkeiten;
II. am Deckglastrockenpräparat, mit oder ohne Fixation der Blutzellen in sog. Fixierungsflüssigkeiten, und mit nachheriger Anwendung der verschiedenen Färbungsmethoden;
III. an Schnittpräparaten des fixierten und gehärteten Blutes, ebenfalls mit Anwendung verschiedener Färbemethoden;
IV. an Gewebsschnitten.

In der Regel bedarf es der kombinierten Anwendung mehrerer dieser Methoden, um zu einem sicheren Resultat zu kommen.

## I. Untersuchung des Blutes im frischen Präparat.

Zur frischen Untersuchung des Blutes benutzt man am besten ein ganz kleines Tröpfchen, welches man der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen nach sorgfältiger Reinigung der Haut mit Äther oder Alkohol durch einen Stich mit einer ausgeglühten Nadel entnimmt. Man tupft das frische Blutströpfchen, das ohne Druck hervortreten muß, mittels eines sorgfältig gereinigten und mit der Pinzette gehaltenen Deckgläschens ab und legt dieses dann vorsichtig auf den gereinigten Objektträger auf. Es ist immer darauf zu achten, daß man eine möglichst geringe Menge von Blut auf den Objektträger bringt, weil man die feineren Strukturen der Blutkörperchen nur an ganz dünnen Schichten studieren kann. Oft ist es empfehlenswert, die Entnahme des Blutes in der Art vorzunehmen, daß man ein Deckgläschen mit Wachs auf dem Objektträger befestigt, den Blutstropfen in den so entstehenden Kapillarraum einfließen läßt und diesen dann durch eine vollständige Wachsumrandung definitiv schließt. In dieser Weise kann man auch Blut am Krankenbett entnehmen und die Untersuchung dann später zu passender Zeit anschließen. Man kann auch nach der Methode von Plehn (s. S. 139) das Blut zwischen zwei Paraffintropfen auffangen.

Arnold empfiehlt zur Untersuchung des lebenden und überlebenden Blutes folgendes Verfahren: Dünne, auf dem Mikrotom hergestellte und in kochender 0,6-proz. Kochsalzlösung sterilisierte Holundermarkscheibchen (auch fertig käuflich bei Mechaniker Jung in Heidelberg) werden auf ein Deckglas aufgelegt, mit einem Tropfen Blut beschickt und dann das mit Vaseline umrandete Deckglas auf einen hohlgeschliffenen Objektträger aufgelegt. Dies Verfahren hat folgende Vorteile: 1) Das Untersuchungsobjekt ist gegen Druck und Verdunstung geschützt. 2) Dasselbe kann der Einwirkung der verschiedensten Reagentien, vor allem der 0,6-proz. Kochsalzlösung ausgesetzt werden, mit denen man das Holundermarkplättchen vor der Beschickung mit Blut befeuchtet. 3) Die dem Plättchen anhaftenden Blutschichten können gut fixiert werden (Osmiumsäure, Formaldehyd, Sublimat). 4) Von diesen Plättchen lassen sich auf einem gewöhnlichen Objektträger sehr gute Abklatschpräparate herstellen, die Arnold zum Studium angelegentlichst empfiehlt. 5) Wenn man die Plättchen mit Körnern von Methylenblau oder Neutralrot bestäubt in den Lymphsack des Frosches bringt, so kann man eine vitale Färbung der Granula erzielen. Im zirkulierenden Blute kann man auch in den roten Blutkörperchen Granula nachweisen.

Eine ebenfalls sehr gute Methode besteht darin, daß man ein ganz kleines Blutströpfchen als hängenden Tropfen mit einem Deckglassplitter bedeckt und in der luftdicht abgeschlossenen Kammer des hohlgeschliffenen Objektträgers untersucht.

Um aus dem frischen Blute die Leukocyten isoliert zur Neutralrotfärbung zu erhalten, verfährt Plato folgendermaßen: Man gibt auf den Objektträger einen Tropfen der Neutralrotlösung und bringt in denselben einige feuchte Faserchen des gewöhnlichen Fließpapiers. Dann setzt man einen Blutstropfen zu und bläst durch ein fein ausgezogenes Glasröhrchen einige Sekunden dagegen. Durch die Wirbelbewegung haften die Leukocyten an den Fäserchen. Legt man nun ein Deckglas auf

und saugt vorsichtig mittels Fließpapiers Neutralrotlösung hindurch, so kann man die roten Blutkörperchen fast völlig entfernen, während die weißen zurückbleiben.

Bewegungserscheinungen und Blutplättchen studiert man am besten an Blut, das man nach Deetjen zwischen Deckglas und einer dünnen Agarschicht sich ausbreiten läßt. Deetjen's Agar hat folgende Zusammensetzung: 5,0 Agar werden mit 500,0 Aqu. dest. durch halbstündiges Kochen gelöst und sofort (heiß) durch ein Faltenfilter filtriert. Zu je 100 ccm des Filtrats werden zugesetzt 0,6 Kochsalz, 6,0—8,0 einer 10-proz. (kalt hergestellten) wässerigen Lösung von metaphosphorsaurem Natrium (Merck) und 5,0 einer 10-proz. wässerigen Lösung von Kaliumdiphosphat. Von diesem Agar gießt man eine dünne Schicht auf einen Objektträger, und schneidet diese auf einen ca. 2 mm breiten Streifen fort. Auf diesen Agarstreifen bringt man das Deckglas mit dem Blutströpfchen und untersucht bei Körpertemperatur.

Auch mit Deckgläschen, die in analoger Weise wie von Nakanishi mit Farbstoffen vorbereitet sind (s. S. 99) kann man ein frisches Blutpräparat behandeln.

Um kernhaltige rote Blutkörperchen in möglichst unverändertem Zustande darzustellen, empfiehlt Pappenheim auf dem Objektträger, entsprechend zwei gegenüberliegenden Ecken des Deckgläschens und der Mitte der gegenüberliegenden Seite eine Spur von Kristallpalastkitt aufzutrocknen. Mit Hilfe eines feinen Pinsels bringt man eine minimale Spur von Neutralrot auf den Objektträger, legt das mit Blut beschickte Deckglas darüber, und umgibt dasselbe sofort mit Wachs. Auch bei diesem Verfahren werden Zusatzflüssigkeiten vermieden. Die Verteilung der Farbe geschieht durch Vermittlung des Blutplasma. Über die Jodräucherungsmethode des feuchten Präparates zum Glykogennachweis s. S. 86. Die schnelle Veränderung der Blutkörperchen im Kontakt mit Wasser, und namentlich die rasche Extraktion des Hämoglobins macht häufig die Anwendung sog. **Konservierungs-** oder indifferenter **Zusatzflüssigkeiten** notwendig.

Zur Konservierung des Blutes dienen folgende Flüssigkeiten:

1) Physiologische Kochsalzlösung. Sehr geeignet. Der zwischen 0,6 und 0,9 Proz. schwankende Konzentrationsgrad muß nach Bizzozero für jede einzelne Tierspezies ausprobiert werden. (Für den Menschen 0,9 Proz.)
2) Blutserum, Lymphe oder Amnioswasser von derselben Tierart. Die Flüssigkeiten können noch mit Jod versetzt werden, oder man kann auch vom Rande des Deckgläschens her eine färbende Flüssigkeit, z. B. Methylgrün in 0,6-proz. Kochsalzlösung, zufließen lassen.
3) Weingelbe Jodjodkaliumlösung ist namentlich geeignet, um die Schatten der roten Blutkörperchen sichtbar zu machen.
4) Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung hat dieselbe Fähigkeit.
5) 0,5-proz. Argentum-nitricum-Lösung.
6) Pacini'sche Flüssigkeit.

| | |
|---|---|
| Hydrargyr. bichlorat. | 1,00 |
| Chlornatrium | 2,00 |
| Aqu. destillata | 200,0. |

7) Hayem'sche Flüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Sublimat | 0,5 |
| Chlornatrium | 1,0 |
| Schwefelsaures Natron | 5,0 |
| Aqu. destillatae | 200,0. |

Das Blut wird mit dieser Flüssigkeit im Verhältnis 1 : 100 gemischt. Beim ruhigen Stehen sinken die geformten Elemente des Blutes zu Boden. Nach 12—24 Stunden dekantiert man, und man kann dann die so erhaltenen gehärteten Elemente auswaschen und färben. Man kann aber auch der Härtungsflüssigkeit direkt Eosin zusetzen.

Die Anwendung dieser Zusatzflüssigkeiten ist dadurch begrenzt, daß sich Dauerpräparate mit ihnen nicht herstellen lassen und daß sie Strukturveränderungen des Zellkernes nicht sicher verhindern.

Diesen Nachteilen begegnet man durch die Anwendung **fixierender Mittel,** durch welche allerdings die äußere Form der Zellen mehr verändert wird.

Es sind hier zu nennen:

1) Essigsäure, am besten 1-proz.
2) Osmiumsäure, 1—2-proz.
3) Flemming'sche Lösung, von manchen Autoren in der Weise modifiziert, daß eine Chromsäurelösung von niedrigerem Prozentsatze gewählt wird.

Die Färbung geschieht entweder durch Zusatz zu der Fixierungsflüssigkeit (z. B. Methylgrün, Methylviolett, Safranin usw.) oder durch nachherige Tinktion, nachdem von dem Blute Schnittpräparate (s. S. 155) angefertigt sind.

Nach Rindfleisch wird das in irgend einer Weise fixierte Blut ausgewaschen, mit einer ganz geringen Menge Glyzerin vermischt und dann auf Glasplatten an staubfreiem Orte dem Trocknen überlassen, soweit dies der Glyzerinzusatz gestattet. Dann wird dasselbe mit einer ganz dünnen Lage von Celloidin übergossen, die sich nach dem Verdunsten als feines Häutchen abziehen läßt. Das Häutchen wird gefärbt usw.

Arnold empfiehlt dasselbe Verfahren ohne Anwendung von Glyzerin.

## II. Deckglastrockenpräparate.

**1) Ausstreichen.** Zur Herstellung derselben müssen verschiedene Vorsichtsmaßregeln angewandt werden. Die Deckgläschen müssen sorgfältig gereinigt sein, entweder nach den bei der Geißelfärbung angegebenen Methoden, oder durch Einlegen in Salzsäure oder Salpetersäure und nachheriges Reinigen in Alkoholäther. Sodann sollen sie nur mit Pinzetten, unter denen die von Ehrlich angegebenen sehr praktisch sind, angefaßt und sorgfältig vor Staub geschützt werden. Die Entnahme des Blutes geschieht unter den S. 143 angegebenen Kautelen. Ein höchstens stecknadelkopfgroßes Blutströpfchen wird auf die Mitte des einen Deckglases gebracht und sofort ein zweites derart darauf gelegt, daß die Ecken des einen über die Kanten des anderen zu liegen kommen, also ein achteckiger Stern gebildet wird. Sind alle Vorsichtsmaßregeln genau beachtet, so breitet sich der Blutstropfen gleichmäßig nach allen Seiten aus. Nun werden beide Deckgläschen derart voneinander abgezogen, daß möglichst jeder Druck vermieden wird.

Man kann auch mit der Kante eines Deckgläschens, das in einem Winkel von 45° dem Blutstropfen angesetzt wird, die Verteilung desselben auf dem Objektträger besorgen, indem man entweder das Blut davor herschiebt oder dahinter nachzieht. Das läßt sich auch mit einem zweiten Objektträger oder mit Kartonpapier erreichen.

**2) Trocknen.** Danach müssen die Ausstrichpräparate an staubfreiem Orte völlig lufttrocken werden.

**3) Fixieren.** Bei der Färbung von Deckglastrockenpräparaten muß man darauf Rücksicht nehmen, daß das Hämoglobin durch die wässerigen Farblösungen extrahiert wird.

Als einen Farbstoff, welcher das Hämoglobin nicht löst, bezeichnet Hayem die Jodjodkaliumlösung. Bringt man eine derartige Lösung von ziemlich intensiv brauner Farbe auf das getrocknete Blutpräparat, so nehmen alle hämoglobinhaltigen Teile sofort eine braune bis violette Farbe an. Es ist daher die Methode die einfachste, um bei Säugetieren auf das Vorhandensein von kernhaltigen roten Blutkörperchen zu untersuchen.

Man kann aber, wie Ehrlich gezeigt hat, das Hämoglobin seiner Löslichkeit und Quellungsfähigkeit berauben, d. h. fixieren, wenn man das auf einem Deckgläschen ausgestrichene Präparat, nachdem es lufttrocken geworden ist, eine oder mehrere Stunden auf einem Kupferblech auf 120—150° erhitzt hält. Diese Methode der Fixierung ist bei weitem die beste, namentlich wenn nachfolgende Färbung mit Triacidlösung erfolgen soll. Eine vorzügliche Fixierung unter wesentlicher Abkürzung der Fixationszeit erhält man nach den sehr präzisen Angaben von Rubinstein. Die zur Fixierung nötige Temperatur, die über 120° beträgt, wird in der Weise ermittelt, daß man auf die durch einen Bunsenbrenner erhitzte Platte mit einem Glasstäbchen Wassertropfen auffallen läßt und die Stelle sucht, an welcher der Tropfen zu sieden anfängt (100°). Je mehr man sich der Stelle der Flamme nähert, um so rascher siedet der Tropfen, bis man eine Zone erreicht, in welcher der Tropfen nicht mehr siedet, sondern als solcher auf der Platte herumrollt; es ist dies die Zone, wo die Temperatur so hoch ist, daß der sphäroidale Zustand eintritt. An dieser Stelle, die unter keinen Umständen überschritten werden darf, erfolgt die Fixierung, die in 30 bis höchstens 45 Sekunden vollendet ist. Rubinstein legt das Deckglas, nachdem es $^1/_2$—1 Minute an der Luft gelegen hat, mit der bestrichenen Seite nach unten auf die Kupferplatte.

Höhere Temperaturen kann man durch folgende Angaben bestimmen: Ein Harnstoffkristall schmilzt bei 135°, ein Tropfen Xylol bei 139°.

Auch durch Einlegen der lufttrockenen Präparate für $^1/_2$—2 Stunden in absolutem Alkohol oder einer Mischung von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen wird Fixierung erreicht. Dieses Verfahren ist aber nicht so universell zweckmäßig. Formol (40-proz.) mit 10 Teilen absolutem Alkohol vermischt, fixiert in einigen Minuten.

Pappenheim erhitzt die Deckglaspräparate 5—25 Minuten lang auf 125°, taucht sie dann 3—5 Sekunden lang in konzentrierte wässerige Sublimatlösung und wäscht ab.

Kniejaskow empfiehlt folgende Modifikation eines von Pappenheim angegebenen Verfahrens: Trocknen des Deckglasblutpräparates an der Luft, dann Fixierung 3 Minuten lang in einer Mischung von gleichen

Teilen 1-proz. wässeriger Osmiumsäurelösung und 2-proz. spirituöser Sublimatlösung, darauf 5—10 Minuten langes Abspülen in reichlichem Wasser, dem 2—3 Tropfen Ameisensäure beigemengt sind. Färbung usw.

Auch durch Einwirken von Dämpfen kann man die Ausstriche fixieren. So kann man in die Höhlung eines hohlgeschliffenen Objektträgers einen Tropfen Osmiumsäure bringen und das bestrichene Deckgläschen auflegen. Oder man bringt den Ausstrich in verschlossenem Gefäß in eine Atmosphäre von Formalindämpfen.

Weidenreich behandelt zuerst einen sauberen Objektträger in Dämpfen von 5 ccm einer 1-proz. Überosmiumsäurelösung, der er 10 Tropfen Eisessig zugefügt hat. Auf die beräucherte Seite erfolgt dann der Blutausstrich, den man nochmals für eine Minute den Osmiumdämpfen aussetzt, 5 mal durch die Flamme zieht und nach dem Erkalten eine Minute mit einer sehr dünnen, hellroten Lösung von übermangansaurem Kali behandelt. Abspülen mit Wasser. Trocknen mit Fließpapier.

H. F. Müller stellt von Blut, dann aber auch von anderen Substanzen, die nicht fest am Deckglas haften, Deckglastrockenpräparate her, bringt die Deckgläschen für einen Moment auf eine ganz dünne Celloidinlösung, läßt abtropfen und lufttrocknen. Darauf kann in der gewöhnlichen Weise nach Ehrlich gefärbt werden.

Nur bei einigen mit Methylalkohol hergestellten Farblösungen ist eine besondere Fixierung unnötig, da die Färbung gleichzeitig Fixierung bewirkt. (Leishmann, May-Grünwald.)

**4) Färben.** Ehrlich hat nachgewiesen, daß die weißen Blutkörperchen in ihrem Protoplasma, außerhalb des Kerns, Körnungen oder Granulationen enthalten, die ein ganz verschiedenes Verhalten gegenüber bestimmten Gruppen von Anilinfarben zeigen. Die in Betracht kommenden Anilinfarben sind:

1) Saure: Eosin, Säurefuchsin, Rubin, Orange G, Indulin, Nigrosin.
2) Basische: Methylenblau, Methylgrün, Methylviolett, Safranin, Fuchsin, Bismarckbraun, Amethystviolett.

Isoliert oder nacheinander werden diese Farbstoffe seltener angewendet, meist in Kombination von sauren und basischen Farbstoffen.

Nach dem verschiedenen Verhalten gegenüber diesen Farbstoffen kann man verschiedene Arten von Granulationen unterscheiden, die Ehrlich als

$\alpha$) Granulationen = eosinophile = acidophile
$\beta$) „ = amphophile
$\gamma$) „ = basophile Mastzellenkörner
$\delta$) „ = kleine basophile
$\varepsilon$) „ = neutrophile Körnelungen

bezeichnet. Außer diesen tinktoriellen Verschiedenheiten lassen die verschiedenen Körnungen auch andere konstante Differenzen erkennen:

1) in ihrem Verhalten gegen Lösungsmittel: Wasser, Säuren, Alkohol, Glyzerin:
2) in ihrer Größe, Form und Lichtbrechung;

3) in ihrem Verhalten gegen höhere Temperaturen;
4) in der Verteilung der Körnung im Zellleib.

A. Wichtig sind zunächst die **eosinophilen** Zellen, d. h. solche, die durch saure Anilinfarben, vor allem durch Eosin, eine intensive Färbung ihrer Granulationen erkennen lassen, = $\alpha$-Körnung oder $\alpha$-Granulationen. Zur Färbung der eosinophilen Zellen verfährt man in folgender Weise:

1) Deckglaspräparat, mehrere Stunden auf 120° erhitzt.
2) Mehrere Stunden Färbung in der Ehrlich'schen sauren Hämatoxylin-Eosinlösung (s. S. 52 u. 60).
3) Abwaschen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Die Kerne der weißen Blutkörperchen, sowohl der Lymphocyten wie der polynukleären, sind ganz dunkel gefärbt, die Kerne der mononukleären bläulich-grau, die roten Blutkörperchen sind kupferrot gefärbt, die eosinophilen Granulationen sind rot.

Man kann auch eine Färbung der nach obiger Methode behandelten Deckgläser 12—24 Stunden lang vornehmen in:

| | | |
|---|---|---|
| Aurantia<br>Indulin<br>Eosin | ana | 2,0 |
| Glyzerin | | 30,0 |

Auswaschen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Die Zellkerne sind blau, die eosinophilen Zellen rot oder rotschwarz, die roten Blutkörperchen kupferrot.

Will man die eosinophilen Zellen allein, unter Verzicht auf Kernfärbung darstellen, so färbt man mit einer einfachen Eosinlösung. Am besten eignet sich stark rote Eosinglyzerinlösung; nachheriges Abspülen in Wasser. Die Darstellung dieser eosinophilen Zellen ist von ganz besonderer Wichtigkeit, weil Ehrlich gezeigt hat, daß dieselben bei gewöhnlichen akuten Leukocytosen nicht vermehrt, daß sie dagegen bei der Leukämie manchmal erheblich vermehrt sind. Im normalen Blut sind sie selten. Nach Ehrlich genügt für die sichere Diagnose auf eosinophile Zellen nicht die Färbbarkeit der Körner in einem der sauren Farbstoffe, sondern es ist der Nachweis der Chromophilie zu sämtlichen sauren Farben erforderlich. Es ist aber die Diagnose gesichert bei der Anwendung folgender Färbeflüssigkeiten:

a) stark rotes Eosin-Glyzerin (12 Stunden ev. unter Erwärmen),
b) gesättigtes Indulin-Glyzerin,
c) gesättigte wässerige Orangelösung,
d) Eosin-Indulin-Glyzerin.

Die Zahl der eosinophilen Zellen beträgt normal 2—4 Proz. aller Leukocyten. Mehr als 6—8 Proz. darf als pathologisch gelten.

B. **Basophile** Granulationen, die sich mit den gewöhnlichen basischen Anilinfarben (bakterienfärbende: Methylenblau, Gentianaviolett, Fuchsin, Bismarckbraun usw.) färben. Es gehören unter diese Gruppe die $\gamma$-Granulationen und die $\delta$-Granulationen. Die $\gamma$-Granulationen werden auch als Mastzellenkörnung bezeichnet. Sie kommen im normalen menschlichen Blute nicht vor, wohl aber sehr zahlreich im leukämischen. Die $\delta$-Granulationen, die ebenfalls mit basischen

Anilinfarben tingierbar sind, finden sich in den mononukleären Übergangsformen des menschlichen Blutes.

Die basophilen $\gamma$-Granulationen sind grobkörnig, die $\delta$-Granulationen feiner.

Ehrlich empfiehlt zur Darstellung der $\gamma$-Granulationen folgende Lösung:

| | |
|---|---|
| Alkohol absolut. | 50,0 |
| Aqu. destillat. | 100,0 |
| Acid. acetic. glacial. | 12,5 |

Dahlia, bis zur fast vollständigen Sättigung.

Färbung mehrere Stunden, Abspülen, langes Ausziehen in Alkohol. Zum Nachweis in Organen ist Alkoholhärtung notwendig, Färben 12 Stunden lang, Ausziehen in Alkohol.

Westphal bedient sich zur gleichzeitigen Kernfärbung folgender Lösung:

| | |
|---|---|
| Grenacher's Karmin (Karmin pur. 2,0 — Aqu. destillat. 200,0 — Alum. 5,0 gekocht, filtriert und Acid. carbolicum 1,0 zugesetzt) | 100 ccm |
| Glyzerin | 100 „ |
| Stark dahliahaltiger Alkohol absolut. | 100 „ |
| Acid. acetic. glacial. | 20 „ |

Abspülen des gefärbten Deckglases, lufttrocken werden lassen, Einschluß in Kanadabalsam.

Die Mastzellen erscheinen als rotviolette Körnerhaufen, deren jeder in seiner Mitte einen Zellenkernfleck trägt. Sämtliche übrigen Kerngebilde sind violett oder blau.

Nach demselben Autor färbt unreines Methylengrün sehr distinkt die $\gamma$-Körner blauviolett, die Kerne grün.

Auch mit Unna's polychromem Methylenblau lassen sich die Mastzellen gut darstellen.

Die $\delta$-Granulationen färbt man 10 Minuten lang in konzentrierter wässeriger Methylenblaulösung, Abspülen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

C. Darstellung der **neutrophilen** Granulationen = $\varepsilon$-Granulationen.

Dieselben färben sich mit neutralen Anilinfarben, d. h. solchen, die durch Vermischung einer basischen mit einer sauren Anilinfarbe entstanden sind. Sie sind dicht gedrängt in den polynukleären Leukocyten vorhanden. Außerdem finden sie sich in den mononukleären Leukocyten des myelämischen Blutes.

Darstellung.

1) Herstellung eines Deckglastrockenpräparates nach der Methode von Ehrlich.
2) Färbung mehrere Minuten in dem Triacidgemisch von Ehrlich:

| | |
|---|---|
| Konzentrierte wässerige Orange G-lösung | 13,0—14,0 |
| Konzentrierte wässerige Säurefuchsinlösung | 6,0—7,0 |
| Aqu. dest. | 15,0 |
| Alkohol absolutus | 15,0 |

| | |
|---|---|
| Konzentrierte wässerige Methylgrünlösung | 12,5 |
| Alkohol | 10,0 |
| Glyzerin | 10,0 |

Diese Lösungen werden nacheinander mit demselben kleinen Meßzylinder, in eine saubere Flasche gegossen, gut abgetropft und gleich immer tüchtig umgeschüttelt. Die Mischung ist sofort nach der Bereitung brauchbar. Da durch das Filtrieren Veränderungen in der Zusammensetzung und außerdem Bildung eines Niederschlags bewirkt werden würde, so verfährt man zur Färbung so, daß man mit einer Pipette aus der Mitte der Flüssigkeit etwas entnimmt und auf das Deckglas bringt.

3) Kurzes Abwaschen in Wasser, schnelles Abtrocknen. Kanadabalsam.

Es erscheint dann das Hämoglobin orangegelb, die Kerne grünlich, die eosinophile Körnung tief dunkelgrau, die neutrophile Körnung intensiv violett, Mastzellengranula ungefärbt.

Die Bereitung der Ehrlich'schen Triacidlösung ist schwierig, es empfiehlt sich daher, sie von Grübler in Leipzig zu beziehen.

In Pappenheim's Triacid (Grübler, Leipzig) ist das Methylgrün durch Methylenblau ersetzt.

Sehr scharfe Bilder gibt auch folgende Methode:

1) Färben 5 Minuten lang in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| Gesättigte wässerige Säurefuchsinlösung | 5 Vol. |

unter Umschütteln allmählich zugesetzt:

| | |
|---|---|
| Konzentrierte wässerige Methylenblaulösung | 1 „ |
| Aqu. destillat. | 5 „ |

2) Oberflächliches Abspülen in Wasser, Absaugen des Wassers mit Fließpapier, Lufttrocknen, Kanadabalsam.

Die Erythrocyten sind rot, die ε-Körnung violett.

Sehr gute Resultate gibt auch das Aronson-Philipp'sche Gemisch:

Orange-G
Säurerubin extra } gesättigte wässerige Lösungen.
Krist. Methylgrün

Von den durch Sedimentieren geklärten Lösungen mischt man:

| | | |
|---|---|---|
| | Orange G | 55 ccm |
| | Säurerubin | 50 „ |
| | Aqua destillata | 100 „ |
| | Alkohol | 50 „ |
| und fügt hinzu | Methylgrün | 65 „ |
| | Aqu. destillat. | 50 „ |
| | Alkohol | 12 „ |

Die Lösung muß mehrere Wochen stehen. Färben mehrere Stunden lang. Abspülen in Wasser, Lufttrocknen, Kanadabalsam. Die Kerne sind grün, Hämoglobin orange, ε-Körnung violettrot, α-Körnung gelbrot.

Von besonderer Wichtigkeit ist, daß diese neutrophile Körnung = ε-Körnung den sogenannten polynukleären Leukocyten angehört, also denjenigen Formen, welche bei der Entzündung hauptsächlich emigrieren. Dieselben machen den Hauptbestandteil der weißen Blutkörperchen im normalen Blut aus; der Eiter besteht der Hauptsache nach aus diesen Leukocyten mit neutrophilen Granulationen.

Auch das Ehrlich'sche neutrale Färbgemisch stellt die neutrophilen Granulationen gut dar; 5 Volumina konzentrierte wässerige Säurefuchsinlösung werden unter fortwährendem Umrühren mit einem Volumen konzentrierter wässeriger Methylenblaulösung gemischt; sodann werden 6 Volumina Aqu. destillat. hinzugemischt. Man läßt mehrere Tage abstehen und färbt mit dem Filtrat 5—20 Minuten. Kerne blau, Erythrocyten rot, neutrophile Körnung violett, eosinophile rot.

D. Für die **Lymphocyten** erzielt man eine rote Protoplasma- und grüne Kernfärbung mit

Pappenheim's Methylgrün-Pyroningemisch: 2—3 Federmesserspitzen Methylgrün 00 Kristall gelblich Grübler und 1—2 Spitzen Pyronin werden in 3—4 ccm Wasser gelöst. (Auch fertig von Grübler, Leipzig zu beziehen.) Färbung 5 Minuten, Abspülen in Wasser.

Die Azurgranula der Lymphocyten sieht man nach Hecht am besten, wenn man Romanowsky-Präparate mit dünner Essigsäure (2—3 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Wasser) behandelt, bis das Präparat rosa erscheint.

E. Von den bisher angeführten Methoden zur Darstellung der verschiedenen Granulationen geben die Triacidmischungen auch gute Übersichtsbilder, und dürfen daher umsomehr eine universelle Bedeutung beanspruchen. Ebenso die Ehrlich'sche Hämatoxylin-Eosinlösung (s. S. 60).

Die besten Übersichts- und Orientierungsbilder erhält man mit den verschiedenen Methylenblau-Eosinmethoden, die seltener nacheinander, meist in Mischung angewandt werden. Man kann die fixierten Deckglaspräparate einige Minuten in 0,25-proz. spirituöser Eosinlösung färben, in Spiritus abwaschen und ganz kurze Zeit in Methylenblaulösung nachfärben.

Gute Präparate erzielt man oft auch, wenn man die beiden Farbstoffe in Formalin löst: 30 ccm gesättigte spirituöse Lösung von Methylenblau auf 100 ccm $2\,^1/_2$-proz. Formalinlösung und 20 ccm einer 1-proz. spirituösen Eosinlösung auf 100 ccm 10-proz. Formalinlösung. Das Methylenblau wird abgewaschen, dann in Eosin gefärbt und abgewaschen.

Ebenso gibt gute Resultate die etwas langsamer färbende, leicht ersetzbare Lösung von Chenzinsky. In dieser sind Methylenblau und Eosin vereinigt:

| | |
|---|---|
| Konz. wässerige Methylenblaulösung | 40 ccm |
| $^1/_2$-proz. Eosinlösung in 70-proz. Alkohol | 20 „ |
| Glyzerin | 20 „ |

Färben unter vorsichtigem Erwärmen bis zum Aufsteigen von Dämpfen $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang oder 12—24 Stunden lang in der Kälte.

**Färbung von Romanowsky-Ziemann.**

Dieselbe hat in den letzten Jahren mancherlei Modifikationen erfahren. Sie ging ursprünglich von der (anscheinend irrtümlichen) Voraussetzung aus, daß sich in einer Mischung von basischem Methylenblau und saurem Eosin ein dritter Farbstoff bilden sollte. Ziemann fand, daß dieser Farbstoff sich in einem Überschuß von Methylenblau oder von Eosin wieder löst. Die Mischung muß also so hergestellt werden, daß eine derartige Lösung verhindert wird, was bis zu einem gewissen Grade Sache des Ausprobierens ist (s. jedoch S. 154). Auch läßt sich nicht mit jedem Methylenblau die charakteristische Färbung erzielen.

Ziemann empfiehlt das Methylenblau med. pur. der Höchster Farbwerke und das Methylenblau rectificat. nach Ehrlich von Dr. Grübler.

Man verfährt nach Ziemann am besten so, daß man sich eine 1-proz. Methylenblaulösung herstellt, diese gut schüttelt, und nach 24 Stunden, wenn sich keine ungelösten Methylenblaustückchen mehr in ihr finden, mit einer 0,1-proz. Eosinlösung, die man sich durch Verdünnung einer 1-proz. herstellt, zusammen mischt. Das Mischungsverhältnis der Methylenblau- zur Eosinlösung beträgt im Anfang meist 1 : 5—1 : 6, kann aber zwischen 1 : 4—1 : 7 schwanken. Bei einer 3 Wochen alten Methylenblaulösung ist das Verhältnis schon 1 : 4,5 bis 5,5.

Die Färbung ist meist in 30 Minuten vollendet, doch kommen auch hier Schwankungen vor. Die Präparate werden in reinem Wasser abgespült, das fortwährend erneuert wird, am besten in dem dünnen Strahl einer Wasserleitung. Die Mischflüssigkeit der beiden Farblösungen muß jedesmal vor dem Gebrauch frisch hergestellt werden. Die Präparate werden in Xylolkanadabalsam eingelegt. Da sich auf der Oberfläche der Mischflüssigkeit ein Häutchen bildet, so empfiehlt es sich nicht, die Präparate auf der Oberfläche schwimmen zu lassen.

Am besten sind nach Ziemann zur Aufnahme der Mischflüssigkeit Blockschälchen mit konkavem Boden oder sonstige Vorrichtungen, welche es verhindern daß das Präparat in seiner ganzen Ausdehnung mit der Bodenfläche in Kontakt kommt, weil sich auf dieser manchmal ein Niederschlag bildet. Vor der Herausnahme des Deckgläschens wird das Häutchen mit Fließpapier entfernt.

In gelungenen Blutpräparaten sind die roten Blutkörperchen rosa gefärbt, die Kerne der sämtlichen Leukocyten karminviolett, das Protoplasma der Lymphocyten blau, die großen Mononukleären blaßblau, die Mastzellen ebenfalls bläulich; das Protoplasma der neutrophilen Leukocyten ist blaß karminviolett, die Granulationen derselben sind noch etwas dunkler, die Granulationen der Eosinophilen erscheinen tiefrot. Der Kern kernhaltiger roter Blutkörperchen ist ebenfalls karminviolett. Auch die Blutplättchen nehmen karminviolette Farbe an. Malariaparasiten, für welche die Färbung in erster Linie angegeben war, werden im Inneren karminviolett, ihr Protoplasma blau gefärbt.

Dem Gesagten zufolge ist die Verwendbarkeit der Färbung eine sehr vielseitige. Tatsächlich ist sie auch schon mit gutem Erfolge zur Darstellung der Strukturverhältnisse der Bakterien, Protozoen und zu Zellstudien verwandt worden. Für manche Zwecke dürfte nach Ziemann eine partielle Entfärbung in ganz dünnen Eosinlösungen gute Dienste leisten. Andererseits kann die Färbekraft noch gesteigert resp. die Färbezeit abgekürzt werden, wenn zu der Methylenblaulösung auf 1 Teil Methylenblau 2,5 Teile Borax zugesetzt werden. Ziemann hält übrigens nicht mehr an der Ansicht fest, daß sich ein neuer Farbstoff bildet. Es könnte auch die polychrome Natur des Methylenblau eine Rolle spielen.

Nochte fand bei seinen Versuchen, die Romanowsky-Ziemann-sche Methode zu vereinfachen, daß ein Zusatz von polychromem Methylenblau zu der Methylenblau-Eosinlösung die Färbung sehr erleichtert. Polychrome Methylenblaulösungen allein, oder mit Eosinlösung vermischt, geben kein befriedigendes Resultat. Am besten verwendet man neutra-

lisierte polychrome Methylenblaulösung. Die Neutralisation bewirkt man in der Art, daß man so lange stark verdünnte Essigsäure zusetzt, bis Lakmuspapier oberhalb der Stelle, bis zu welcher die Farbstofflösung selbst vordringt, rot gefärbt wird. Dann neutralisiert man — ebenfalls tropfenweise — mit polychromer Methylenblaulösung selbst zurück, bis an einem weiteren Reagenzpapier kein roter Streifen mehr auftritt.

Diese neutralisierte polychrome Methylenblaulösung wird mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und dann tropfenweise von einer beliebigen, konzentrierten Methylenblaulösung zugesetzt, bis der polychrome Farbenton verschwunden ist, und die Lösung rein blau aussieht. Die Lösungen müssen sämtlich wässerig sein, ohne Beimengung von Spiritus. Von der so erhaltenen Methylenblaulösung tropft man soviel in verdünnte Eosinlösung, bis auch diese dunkelblau geworden ist. Die Vorteile der Modifikation von Nochte sind der geringere Niederschlag, das Ausbleiben der Häutchenbildung und die konstant guten Resultate. Man kann das Deckgläschen auf der Farbe schwimmen lassen. Zu dunkle Präparate werden vorsichtig mit ganz verdünnter Essigsäure entfärbt.

Rosin hat gezeigt, daß durch Vereinigung des sauren Eosin und des basischen Methylenblau ein neuer Farbkörper entsteht, der in Wasser fast gar nicht, in Alkohol leichter löslich ist, und aus diesem in Kristallform erhalten werden kann. Rosin bezeichnet diesen Farbkörper als eosinsaures Methylenblau. Dasselbe ist leicht löslich in Methylenblau- und in Eosinlösung und dürfte nach Rosin in dieser Form eine weitere Verbreitung in der Färbetechnik finden. Dieser Farbstoff färbt nämlich alle sauren Substanzen blau, alle alkalischen rot und alle neutralen violett. Schwach saures Celloidin wird blau, Eiweiß rot, Mucin blau, Nuclein blau, Fibrin rot. In Gewebsschnitten werden die Kerne immer blau, Protoplasma immer rot. In den Nervenzellen wird das Protoplasma rosarot. Die Nissl'schen Granula werden blau, während sich die Kerne der Nervenzellen nicht färben.

Rosin ist der Ansicht, daß dieser neugebildete Farbkörper das wirksame Prinzip bei der Romanowsky-Ziemann'schen Färbung ist. Diese Ansicht wird von Nochte bestritten, da das eosinsaure Methylenblau nicht dieselbe färberische Wirkung hat, wie die Romanowsky'sche Methode, namentlich die als Kerne der Malariaparasiten aufzufassenden Gebilde vollständig ungefärbt läßt.

Nach neueren Untersuchungen Nochte's läßt sich aus älteren, namentlich alkoholischen Methylenblaulösungen durch Chloroform ein roter Farbstoff ausziehen, den man nach langsamer Verdunstung des Chloroforms isolieren kann. Er löst sich ziemlich leicht in kaltem Wasser mit rot-violetter Farbe. Der Körper ist weder mit dem Methylenrot noch mit dem Methylenviolett identisch. Nochte nennt ihn „Rot aus Methylenblau".[1]) Dieses Rot aus Methylenblau färbt oft schon allein die Jugendformen der Malariaparasiten spezifisch, den Kern rot, einen Teil des Parasitenleibes blau, einen anderen läßt es ungefärbt. Vorzüglich färbt eine Ziemann'sche Eosin-Methylenblaulösung, auch wenn sie vorher im Stiche läßt, wenn man ihr einige Tropfen Rot aus Methylenblau zusetzt. Am leichtesten und schnellsten gelingt die hierdurch sehr vereinfachte Methode bei Anwendung alkoholischer Lösungen. Das Rot aus Methylenblau ist nach Nochte in gewissen Methylenblaumarken, in gereiften und namentlich in älteren alkoholischen Lösungen von vornherein vorhanden, oft aber nur in Spuren, so daß schon ein geringer Überschuß von Methylenblau oder Eosin bei den Mischungen ins Gewicht fällt. Borax-Methylenblaulösungen enthalten ziemlich reichliche Mengen von Rot aus Methylenblau, namentlich, wenn man sie einen Tag bei 50°—60° hält. Nochte empfiehlt Lösungen von 1 Proz. Methylenblau und $^1/_2$ Proz. Soda. Von dieser gibt Nochte soviel zu seiner verdünnten Eosinlösung, daß die Eosinbeimischung

[1]) Dieser Farbstoff ist nach Michaelis identisch mit Methylenazur (= Azur I); der neuerdings häufig gebrauchte Farbstoff Azur II ist eine Mischung von reinem Methylenblau und reinem Azurblau zu gleichen Teilen.

nicht mehr zu erkennen ist. Auf dieser Lösung schwimmen die Deckgläschen 5—10 Minuten.

Laurent hat das Mengenverhältnis zwischen Methylenblau und Eosin genau festgestellt. 1000 ccm 1‰ Eosinlösung werden mit 882 ccm 1‰ Methylenblaulösung zusammengegossen; nach 48 Stunden ist der neutrale Farbstoff ausgefallen. Unmittelbar vor dem Färben wird die gut geschüttelte Farbflüssigkeit mit 4 Teilen Wasser verdünnt und gekocht. Sofort nach dem Kochen wird gefärbt, ½—6 Stunden lang. Entwässern der Deckglaspräparate ohne vorheriges Abspülen und Differenzieren in absolutem Alkohol, bis keine Farbwolken mehr abgehen. Xylol. Balsam. Schnitte werden in 96-proz. Alkohol kurz abgespült und in absolutem, eventuell zu erneuerndem Alkohol differenziert, 2—10 Minuten lang. Bis zu 6 Stunden langes Verweilen schadet aber auch nicht.

### Färbung nach Leishman.

Der Leishman'sche Eosin-Methylenblaufarbstoff ist bei Grübler zu haben. Man löst davon 0,3 g in reinem Methylalkohol 200,0 g. Die Lösung ist in gut verschlossener Flasche haltbar. Die Fixierung erfolgt gleichzeitig mit der Färbung, so daß man gleich auf das lufttrockene Präparat 4 Tropfen Farblösung gießt, nach ½ Minute mit 6—8 Tropfen destilliertem Wasser verdünnt und mischt. Nach 5—10 Minuten Abspülen in destilliertem Wasser. Man läßt noch etwa 1 Minute Wasser auf dem Präparate stehen, trocknet an der Luft und schließt in Balsam ein.

### Färbung nach May-Grünwald.

1 Liter 1‰ wässerige Eosinlösung wird mit 1 Liter 1‰ wässerige Lösung von Methylenblau medic. gemischt und nach einigen Tagen mit Hilfe der Saugpumpe filtriert. Das Filter wird mit kaltem destillierten Wasser so lange durchgespült, bis das Filtrat ungefärbt bleibt. Von dem getrockneten Filtratrückstand wird eine gesättigte Lösung in Methylalkohol hergestellt und gut verschlossen gehalten. (Auch fertig bei Grübler zu haben.) Auch hierbei ist vorherige Fixierung unnötig. Zur Färbung bringt man entweder auf das lufttrockene Präparat 5—10 Tropfen Farblösung, verdünnt nach 2 Minuten mit derselben Tropfenzahl destilliertem Wasser und färbt nochmals 5 Minuten. Oder man färbt 1 Minute mit unverdünntem Farbgemisch, spült kurz mit Wasser ab, färbt wieder ½ Minute, spült ab und färbt nochmals ½ Minute und spült ab. Trocknen. Einschluß in säurefreien Balsam. Sind die Kerne zu schwach gefärbt, kann man mit verdünntem Methylenblau (1 Teil konzentriert wässerige Lösung auf 5 Teile Wasser) 5—10 Sekunden lang nachfärben.

### Färbung nach Assmann.

1) Einlegen des unfixierten Objektträgers in eine saubere Petrischale und Übergießen mit 40 Tropfen der methylalkoholischen Lösung von Eosin-Methylenblau (Grübler), so daß diese nicht über den Rand des Objektträgers überläuft. Fixation 3 Minuten lang.

2) Übergießen mit 20 ccm destillierten Wassers, denen zuvor 5 Tropfen einer 1‰ Kalium-carbonicum-Lösung unter kräftigem Schütteln beigemischt wurden. Umschütteln der Schale, bis eine gleichmäßig klare, hellviolette Lösung entstanden ist. Färben 5 Minten lang.

3) Herausnehmen, Abtrocknen ohne weitere Abspülung, Kanadabalsam.

**Färbung nach GIEMSA** (s. S. 131.)

BREMER's Reaktion an Diabetikerblut beruht auf reduzierenden Substanzen, ist aber gelegentlich auch bei anderen Krankheiten positiv. Man beschickt am besten ein Deckglas bis zur Hälfte mit normalem, zur andern mit dem zu untersuchenden Blut, fixiert 2 Stunden bei 120° oder 4 Minuten in Alkohol-Äther bei 60°. Färben 2 Minuten in 10-proz. wässerigem Methylenblau und dann 10 Sekunden 0,1-proz. wässerigem Eosin. Auswaschen, Trocknen, Kanadabalsam. Normale Erythrocyten rot, diabetische fast farblos. Bei alleiniger Färbung mit 2-proz. Methylenblaulösung wird normales Blut blau, diabetisches gelblichgrün. Auch im hängenden Tropfen kann die Reduktion alkalischer Methylenblaulösung zu einem farblosen Körper festgestellt werden.

### III. Untersuchung von Blutschnitten nach BIONDI.

Zur Untersuchung des vorher fixierten Blutes in einer Art von Schnittpräparaten hat BIONDI eine Methode angegeben, die sich auch für andere flüssige Gewebsbestandteile eignet.

Einige Tropfen Blut werden in 5 ccm einer 2-proz. Osmiumsäurelösung gebracht und in derselben durch Umschütteln verteilt. Später senken sich die zelligen Elemente zu Boden. Nach 24 Stunden (nicht länger!) entnimmt man mit der Pipette 1—2 Tropfen der Osmiumsäurelösung und überträgt sie in 5 ccm Agar-Agar (Agar nach BIONDI zu beziehen von Herrn König, Berlin, Dorotheenstraße 29), welches bei 33—37° verflüssigt wird. In demselben wird das Blutosmiumsäuregemisch wieder durch Schütteln verteilt, dann wird das Agar in Papierkästchen ausgegossen, wo es rasch erstarrt. Nun wird der Agarblock in 85-proz., mehrmals zu wechselndem Spiritus gehärtet und geschnitten, eventuell zwischen Holundermark. Färbungen lassen sich sehr gut anwenden, da selbst intensive Anilinfärbungen von dem Agar in Alkohol wieder abgegeben werden. Zum Aufhellen der Schnitte ist Xylol zu vermeiden. Die ätherischen Öle sowie Kreosot sind dagegen anwendbar.

Noch feinere Schnitte erhält man nach BIONDI durch eine Kombination der Agareinbettung mit Paraffindurchtränkung. Der das Blut enthaltende Agarblock wird für einen Tag in Bergamottöl gebracht, kommt aus diesem direkt für 1—2 Stunden in Paraffin von 45°, dann läßt man ihn in Papierkästchen im Wasser erstarren. Vor der Färbung Entfernung des Paraffins.

Einfacher ist das Verfahren von P. GRAWITZ: Man läßt das Blut direkt in FLEMMING'sche Lösung tropfen. Nach 24 Stunden werden die Coagula mehrere Stunden in fließendem Wasser gewaschen, in Alkohol gehärtet und in Paraffin eingebettet. Die aufgeklebten Schnitte werden in gewöhnlicher Weise gefärbt und weiterbehandelt.

### IV. Schnittfärbung von Blutelementen und Zellkörnelungen.

Hierzu kommen die verschiedenen Härtungsmethoden in Betracht. Besondere Anerkennung haben aber Formalin, gesättigte Sublimatlösung, die ZENKER'sche Flüssigkeit (s. S. 18) und die unten zu erwähnende Flüssigkeit von FOÀ gefunden.

In ZENKER'scher Flüssigkeit werden die Präparate nach MERCIER 24 Stunden lang fixiert, dann in mehrmals zu wechselnden 50-proz. bis 70-proz. bis 90-proz. Alkohol nachgehärtet. Dann kommen die Stückchen

für 10—15 Tage in 90-proz. Jodalkohol ($^1/_2$—$^3/_4$-proz. Jodtinktur) dem man, wenn er sich entfärbt, immer wieder einige Tropfen Jodtinktur zusetzt. Dann absoluter Alkohol usw.

Fol empfiehlt Härtung kleiner Stückchen, 2—3 Stunden lang, manchmal 24 Stunden lang, bei 39—40° in Sublimat 2 g in fast siedender Müller'scher Flüssigkeit 100 ccm gelöst. Dann Alkohol, der so oft gewechselt wird, bis er ganz rein bleibt.

In dieser Härtungsflüssigkeit behalten die roten Blutkörperchen ihr Hämoglobin bei. Zur Färbung, namentlich der kernhaltigen roten Blutkörperchen, kommen die Schnitte für 1—3 Minuten, manchmal 15—20 Minuten in

| | | |
|---|---|---|
| Hämatoxylinlösung | 25 | Teile, |
| Aqu. destillat. | 100 | „ |
| 1-proz. wässerige Saffraninlösung | 20 | „ |

Dann Auswaschen in Wasser, Übertragen entweder in starke alkoholische Pikrinsäurelösung, Xylol, Balsam oder schwache Orangelösung, Wasser, absoluten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Trambusti benutzt zur Unterscheidung der Leukocyten von den Erythrocyten in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien das Vorhandensein von Granulationen in den Leukocyten. Die in Flemming'scher Lösung gehärteten Präparate werden 24 Stunden lang in einer 1-proz. Thioninlösung in Anilinwasser (4 : 100) gefärbt, die überfärbten Schnitte in salzsaurem Alkohol ausgewaschen und dann zuerst in wässerige und weiterhin in spirituöse Lösung von Eosin gebracht. — Xylolkanadabalsam.

Folgende Methoden sind angegeben worden, um das Prinzip der Romanowskyfärbung auf Schnittpräparate zu übertragen und sind nicht nur zur Darstellung von Zellkörnelungen, sondern auch von Bakterien und Protozoen (besonders Blutparasiten) zu empfehlen.

1) Färbung nach Sternberg. Am besten Alkoholfixierung, dünne Paraffinschnitte, Färbung 20—24 Stunden in verdünnter Giemsalösung (s. S. 131), etwa 0,4—0,5 ccm auf 20 ccm gekochtes destilliertes Wasser, Abspülen in Wasser, kurze Differenzierung in $^1/_2$-proz. Essigsäure bis der Schnitt rötlich wird, Abwaschen in Wasser und Abtrocknen, kurze Differenzierung und Entwässerung in absolutem Alkohol, wobei die Präparate wieder einen bläulichen Farbenton annehmen. Abtrocknen, Xylol, Balsam.

2) Färbung nach Schridde. Müller-Formol oder andere Fixierung. Dünne Paraffinschnitte. Färben 20 Minuten in verdünnter Giemsalösung (2 Tropfen auf je 1 ccm destilliertes Wasser). Sorgfältiges Auswaschen in Wasser, Abtrocknen mit Fließpapier. 1 Minute oder länger in Aceton puriss. (Kahlbaum), (eintretende Entfärbung beweist Säuregehalt des Acetons). Säurefreies Toluol oder Xylol, neutraler Kanadabalsam. (rectif. neutr. Grübler). Die fertigen Präparate werden im Dunkeln aufbewahrt. Bei diesem völligen Vermeiden von Säuren und Alkohol färben sich auch die neutrophilen Zellkörnelungen, bei Sternberg dagegen nur die eosinophilen und basophilen.

3) Färbung nach Zieler 2—3 Minuten in konzentrierter Lösung (etwa $^1/_4$-proz.) des May-Grünwald'schen Farbstoffs (Grübler) in reinem Methylalkohol, die Lösung darf nicht aufgeschüttelt werden.

Gründliches Auswaschen in Wasser, Entwässerung in Aceton usw. wie bei Schridde. Neutrophile Granulationen rot bis rotviolett, eosinophile lebhaft rot, basophile schwarzblau. Erythrocyten blaßgrün bis orange, Protoplasma rosarot, Kerne blau. Helly verwendet flüchtige Überspülung mit Essigsäure (1 : 3000) und absoluten Alkohol zur Entwässerung.

4) Färbung nach Assmann. 15 Minuten in folgender Farblösung: zu 40 Tropfen methylalkoholischen Eosin-Methylenblau (Grübler) setzt man 20 ccm destilliertes Wasser, dem 5 Tropfen einer 1‰ Essigsäurelösung beigemischt sind. Kurzes Abspülen in absolutem Alkohol (durch Kupfersulfat völlig wasserfrei gehalten), Xylol, neutraler Kanadabalsam.

Zur Färbung der **Mastzellen** im Schnitt stehen außer dem zuletzt erwähnten Methoden noch die Färbungen von Ehrlich und Westphal zur Verfügung. Man fixiert in Alkohol, färbt 12—24 Stunden in den auf S. 149 angeführten Farblösungen, wäscht in Alkohol aus und bringt die Schnitte durch Öl in Balsam. Die Gewebskerne sind rot gefärbt, die Granulationen der Mastzellen und Bakterien blau.

Darstellung der **Plasma- und Mastzellen** nach Unna, besonders für Hautschnitte angegeben.

I. 1) Alkoholhärtung. Färben in eventuell erwärmter Lösung von:

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 1,0 |
| Kali caust. | 0,05 |
| Aqu. | 100,0. |

2) Entfärben in Cresol.

3) Trocknen zwischen Fließpapier oder rasche Entwässerung in absolutem Alkohol.

Wenn man in absolutem Alkohol entwässern will, so muß man die Schnitte etwas stärker färben und sie aus dem Alkohol entfernen, wenn die Oberhaut sich als dunkler Streifen von der Cutis abhebt.

II. Eine weitere, sehr gute Methode von Unna ist folgende:

Die Schnitte der in Alkohol gehärteten Präparate werden in altem basischem Methylenblau, welches methylenviolett- und methylenrothaltig ist und daher auch als polychromes Methylenblau bezeichnet wird, überfärbt, 1/4—12 Stunden lang. Dann Abspülen in Wasser und Differenzieren in Unna'scher Glyzerin-Ätherlösung (von Dr. Grübler, Leipzig, zu beziehen), gewöhnlich 1/4 Minute lang, sehr sorgfältiges Abspülen in Wasser, Alkohol, Bergamottöl, Kanadabalsam.

Nach Krompecher kann man auch durch Auswaschen in Alkohol differenzieren. Manchmal empfiehlt sich Härtung in Alkohol von steigender Konzentration. Auch Formalin und Sublimat können zur Härtung verwandt werden.

III. Eine andere gute Methode mit polychromem Methylenblau ist folgende: starke Überfärbung in polychromem Methylenblau meist 1/2 Stunde lang, dann Abspülen in Wasser, Trocknen zwischen Fließpapier, dann gleichzeitige Entwässerung und Differenzierung, 3—5 Minuten lang in einer Mischung von:

| | |
|---|---|
| Alkohol | 10,0 |
| Xylol | 15,0 |
| Anilinöl | 25,0. |

Dann reines Xylol, Balsam.

Nach Marschalko kann man zur Darstellung der Plasmazellen

auch in Borax-Methylenblaulösung oder in Thioninlösung färben und mit schwach saurem Wasser oder in 70-proz. Alkohol differenzieren. Dann Entwässerung in absolutem Alkohol usw.

Die basophilen Granulationen der Mastzellen kann man nach Krompecher in folgender Weise darstellen: Färben 24 Stunden lang in Fuchsinanilinwasserlösung, Entfärben bis die Schnitte hellrot geworden sind, in 50-proz. alkoholischer Fluoresceinlösung, Nachfärben in alkoholischer Methylenblaulösung.

IV. Bei der Methode IV sind Entwässerung und Differenzierung getrennt. Die stark, 12 Stunden lang, in polychromem Methylenblau überfärbten Schnitte werden kurz in Wasser abgespült, auf dem Spatel von dem überflüssigen Wasser befreit, zur Entwässerung für 1 Minute in eine Mischung von 20 Teilen absolutem Alkohol und 30 Teilen Xylol, dann in reines Xylol gebracht. Dann werden die Schnitte differenziert, 5—10 Minuten lang, in Anilinöl, welches Alaun in Überschuß als Bodensatz enthält, und vor dem Gebrauch erst zu schütteln und dann zu filtrieren ist. Schließlich Abspülen in Xylol, Balsam.

Schnittfärbung der **Plasmazellen** nach Pappenheim.

1) Härtung in absolutem Alkohol. Gefrier, Celloidin- oder Paraffinschnitte.
2) Färben 10 Minuten oder länger in Pappenheim's Methylgrün-Pyroninlösung (s. S. 151).
3) Rasches Entfärben in Alkohol.
4) Bergamottöl — Balsam.

Kerne grün, Protoplasma der Plasmazellen rot.

**Naphtholblaureaktion** der Leukocytenkörnelungen s. Nachtrag S. 210.

## V. Untersuchung der Blutplättchen.

Die Blutplättchen sind flache, ovale Scheiben, die in ihrer Größe schwanken und ein Drittel der Größe eines roten Blutkörperchens erreichen können.

Bei ihrer Darstellung muß man berücksichtigen, daß sie auf den geringsten Reiz, auch den der Luft, sehr erhebliche Gestalts- und Formveränderungen eingehen.

Man verfährt deshalb so, daß man auf die eigene Haut oder auf die Haut des rasierten Warmblüters einen großen Tropfen 1-proz. Osmiumsäure bringt und durch diesen hindurch die Haut ansticht. In dem Blut, welches sich dann, ohne mit der Luft in Berührung zu kommen, in der Osmiumsäure verteilt, kann man die Blutplättchen gut untersuchen.

Statt der, namentlich von Eberth und Schimmelbusch empfohlenen Osmiumsäure kann man sich auch einer Lösung bedienen von

| | |
|---|---|
| Methylviolett | 0,01 |
| 0,6-proz. Kochsalzlösung | 50,0 |

Ein weiteres Mittel zur Veranschaulichung der Blutplättchen besteht in der sehr schnell vorgenommenen Erhitzung eines Trockenpräparates nach Ehrlich (s. S. 146).

Besonders gut läßt sich ihre Entstehung und Gestaltveränderung mittels der Deetjen'schen Methode (s. S. 144) verfolgen.

Die Blutplättchen färben sich in Trockenpräparaten in konzentrierten wässerigen Lösungen von Methylviolett, Anilingrün, Fuchsin diffus. Haben sie sich aber schon, was meistens geschieht, in einen zentralen körnigen Teil und eine homogene periphere Partie differenziert, so färbt sich das Zentrum etwas intensiver. Gut färben sie sich auch nach Romanowsky-Ziemann (s. S. 151) und den anderen Methylenblau-Eosinmethoden (Giemsa, May-Grünwald).

## VI. Fibrinbildung.

Arnold empfiehlt zur direkten Untersuchung der Fibrinbildung die oben beschriebene Holunderplättchenmethode (S. 143). Um den vitalen Gerinnungsprozeß zu studieren, werden die Plättchen in eine Hauttasche eingeführt, sobald Blutung eingetreten ist. Man kann die Plättchen direkt untersuchen oder nach Konservierung in 1-proz. Osmiumsäure, Müller'scher Lösung mit Sublimat, 4-proz. Formol; dann Härtung in Alkohol von steigender Konzentration, Einbettung in Celloidin. Als Färbung wendet Arnold an: Hämatoxylin-Eosin, van Gieson, Eisenhämatoxylin nach Heidenhain (S. 52) die Weigert'sche Markscheidenfärbung und die Weigert'sche Fibrinmethode. Um ein Einreißen beim Herausnehmen der Plättchen zu verhindern, die oft schon nach 12 Stunden festhaften, ist es praktisch, mehrere Plättchen aufeinander geschichtet in das Unterhautbindegwebe einzuführen. Nach Verlauf mehrerer Tage muß man die Plättchen, nachdem die Tiere durch Verbluten getötet sind, aus der Haut herausschneiden. Man kann die Plättchen auch verschieden lange Zeit, bis zu mehreren Stunden, in eine kleine feuchte Kammer übertragen.

Auch in den Lymphsack von Fröschen hat Arnold die Plättchen gebracht, bis su 28 Tagen liegen lassen und das ganze Tier lebend in Konservierungsflüssigkeit übertragen.

Man kann nach Löwit die Fibrinfärbung auch am frischen Blutpräparat vornehmen. Man wartet den Eintritt der Gerinnung unter dem Deckglas ab und zieht dann zunächst vom Rande des Deckglases her eine 0,6-proz. Kochsalzlösung durch, bis die roten Blutkörperchen angeschwemmt sind. Die Leukocyten und Blutplättchen bleiben meist zurück. Dann folgen Alkoholdurchspülung und die einzelnen Prozeduren der Weigert'schen Methode, die sämtlich unter dem Deckglas vorgenommen werden. Fibrinfärbungen s. S. 74.

## VII. Fremde Bestandteile im Blut.

Zur Untersuchung des Blutes auf Pigment genügt eine einfache Verteilung feinster Bluttröpfchen in einem Tropfen 0,6-proz. Kochsalzlösung.

Außerdem kann man Trockenpräparate ungefärbt, oder mit Anilinfarben gefärbt, herstellen.

Der Nachweis extra- und intracellulären Glykogens im Blute wird nach den (S. 85) angegebenen Regeln geführt.

Von Schizomyceten kommen im Blute des lebenden Menschen hauptsächlich Milzbrandbazillen und Rekurrensspirillen vor. Auf Milzbrandbazillen untersucht man Deckglastrockenpräparate, die nach Gram gefärbt sind, oder Bluttropfen frisch. Bei Tieren, die mit Milzbrand infiziert sind, kann man das Blut auch sehr gut im hängenden Tropfen untersuchen.

Will man auf andere Mikroorganismen, speziell auf Kokken, untersuchen, so ist das Kulturverfahren kaum zu entbehren. Bei gefärbten Präparaten muß man sich vor allem vor einer Verwechslung mit den basophilen $\gamma$- und $\delta$-Granulationen (s. S. 148) hüten, die sich ebenso wie die Bakterien mit den basischen Anilinfarben tingieren. Die $\delta$-Granulationen sind so fein, daß sie mit den bekannten Kokkenformen nicht verwechselt werden können. Die Körner der Mastzellengranulationen können dagegen den Kokken sehr ähnlich sein, sind aber gewöhnlich nicht so gleichmäßig groß wie die letzteren.

Man kann sich die Bakterienfärbung von Bluttrockenpräparaten sehr erleichtern, wenn man dieselben 10 Sekunden lang mit 1—5-proz. Essigsäure behandelt, danach gründlich auswäscht und nun färbt.

Auf diese Weise wird das Hämoglobin aus den roten Blutkörperchen ausgezogen und die Bakterien werden fast isoliert gefärbt.

Anderseits kann man in Präparaten, die nach Gram gefärbt werden sollen, aber auch die roten Blutkörperchen deutlich hervortreten lassen, wenn man dem zur Entfärbung benutzten Alkohol etwas Eosin zusetzt.

Rekurrensspirillen können während des Fieberanfalles im frischen Blut untersucht werden. Sie sind an ihrer lebhaften Eigenbewegung zu erkennen. In Trockenpräparaten Färbung mit Bismarckbraun in wässeriger oder in Glyzerinlösung oder mit Löffler's Methylenblau. S. außerdem S. 130.

Über Malariaplasmodien s. S. 139. Trypanosomen S. 139.

## VIII. Zählung der Blutkörperchen.

Zur Zählung der Blutkörperchen bedarf es einer vorherigen Verdünnung des Blutes. Man bedient sich dazu einer Pipette, welche in ihrer Mitte eine ampullenartige Erweiterung trägt. Diese Ampulle hat genau den 100fachen Kubikinhalt von demjenigen Teil der Pipette, der unterhalb der Ampulle gelegen ist. Man verfährt nun so, daß man zunächst die Pipette bis an die Grenze der Ampulle mit Blut füllt und dann so viel von der Verdünnungsflüssigkeit nachzieht, daß die Ampulle gerade gefüllt wird. Auf diese Weise erreicht man eine 100fache Verdünnung.

Als Verdünnungsflüssigkeit nimmt man isotonische (0,9-proz.) Kochsalzlösung, die Pacini'sche (S. 181) oder Hayem'sche (S. 145) Flüssigkeit. Will man die meisten Blutkörperchen möglichst deutlich von den roten unterscheiden, so setzt man der Kochsalzlösung etwas Methylviolett hinzu und filtriert. Oder man wählt die Verdünnungsflüssigkeit von Toison:

| | |
|---|---|
| Methylviolett | 0,025 |
| Neutr. Glyzerin | 30 ccm |
| Aqu. destillata | 80,0 |

Dazu kommt eine Lösung von

| | |
|---|---|
| Chlornatrium | 1,0 |
| Schwefelsaures Natr. | 8,0 |
| Aqu. destillata | 80,0. |

Dann wird filtriert.

Nach 5—10 Minuten sind die weißen Blutkörperchen violett tingiert.

Mit dem durch diese Flüssigkeiten auf das 100fache verdünntem Blute füllt man nun den THOMA-ZEISS'schen Zählapparat (zu beziehen von C. Zeiß, Jena). Derselbe besteht aus einer 0,1 mm tiefen feuchten Kammer, deren Boden in 400 Quadrate eingeteilt ist, von denen je 16 dadurch übersichtlich zusammengefaßt sind, daß jede fünfte horizontale und vertikale Quadratreihe noch einmal halbiert ist. Die Flüssigkeitsschicht über jedem Quadrate beträgt $^1/_{4000}$ cmm.

Es werden dann in möglichst vielen Quadraten die Blutkörperchen gezählt, und zwar nicht nur diejenigen, die sich im Quadratraum selbst befinden, sondern auch diejenigen, welche auf den Linien des Quadrats liegen. Um doppelte Zählung zu vermeiden, zählt man von den letzteren nur die in der linken und oberen Begrenzungslinie liegenden mit, und vernachlässigt die an der rechten und an der unteren.

Zur Berechnung multipliziert man den Kubikinhalt 4000 mit der Zahl der Verdünnung und mit der Zahl der gezählten Blutkörperchen und dividiert durch die Anzahl der gezählten Felder. Die Zahl, die man erhält, ergibt die Zahl der Blutkörperchen in einem Kubikmillimeter. In einer Formel ausgedrückt, ist die Berechnung folgende:

$$x = \frac{4000 \cdot v \cdot z}{n}$$

$x$ = Zahl der Blutkörperchen in einem Kubikmillimeter unverdünnten Blutes, $v$ = Verdünnung, in den meisten Fällen also = 100, $z$ die Zahl der Blutkörperchen in den gezählten Quadraten. $n$ = Anzahl der gezählten Felder. Hat man also bei 100facher Verdünnung 40 Quadrate gezählt, so kann man die gefundene Zahl einfach mit 10 000 multiplizieren.

Will man bloß die weißen Blutkörperchen zählen, so kann man nach dem Vorgang von THOMA das Blut im Verhältnis 1 : 10 mit Wasser verdünnen, welches 0,3-proz. Essigsäureanhydrid enthält. Die roten Blutkörperchen werden dann gelöst und dadurch das Zählen der weißen sehr erleichtert.

## Untersuchung des Herzens und der Gefäße.

Der Zustand des Herzmuskels läßt sich sehr gut an frischen Zupfpräparaten untersuchen, bei denen die Zerzupfung nur hinreichend fein ausgeführt werden muß. Zur Unterscheidung der trüben Schwellung von der Verfettung bedient man sich der in Kap. 1 (s. S. 11 und 12) angegebenen Reagentien, Essigsäure einerseits und anderseits 1-proz. Osmiumsäure (s. auch S. 95).

Pigmentdegeneration des Herzmuskels erkennt man ebenfalls gut an Zupfpräparaten.

Die Härtung geschieht in MÜLLER'scher Flüssigkeit, Alkohol oder Formalin.

Degenerative Veränderungen werden, soweit Verfettung in Frage kommt, an Präparaten aus FLEMMING'scher Lösung oder der Flüssigkeit von MARCHI oder mit Sudanfärbung untersucht. Für hyaline Degeneration usw. kommt Alkohol- und Formalinhärtung und Färbung nach VAN GIESON hauptsächlich in Betracht.

Schnittpräparate bettet man zweckmäßig in Celloidin ein und färbt mit Kernfärbemitteln. Die Karminfärbungen, Lithionkarmin und Borax-

karmin, verdienen namentlich dann den Vorzug, wenn es sich um den Nachweis von Pigment handelt. Pikrokarmin läßt die quergestreiften Muskelfasern sehr deutlich hervortreten.

Die Schaltstücke oder Querlinien der Herzmuskulatur stellt man mit den HEIDENHAIN'schen Neutralfärbungen dar.

1) Sublimatfixierung. Dünne Paraffinschnitte.
2) Beizung mit 0,5—1-proz. Lösung von Thiazinrot oder Thiazinbraun, oder gesättigter Lösung von Cocrulcïn S.
3) Färbung mit Safranin (0,5—1-proz.), Toluidinblau (0,1-proz.), Thionin oder Methylenblau (0,05-proz.) 1—12 Stunden.
4) Differenzierung in Alkohol; extrahiert dieser nicht kräftig genug, in Methylalkohol.
5) Xylol — Balsam.

Endokarditische Effloreszenzen und Klappenvegetationen kann man frisch auf Bakterien in Deckglastrockenpräparaten untersuchen, die man so herstellt, daß man die Auflagerungsmassen direkt auf Deckgläsern abreibt, oder auch so, daß man sie in etwas sterilisiertem und filtriertem Wasser vermittelst eines ausgeglühten Glasstabes verreibt und von der Flüssigkeit auf Deckgläser aufstreicht.

Schnittpräparate sind in Celloidin einzubetten. Auch Paraffineinbettung kann angewandt werden.

Zur Färbung von Bakterien dient entweder die einfache Tinktion mit Gentianaviolett und Auswaschen in Alkohol (s. S. 111) oder die GRAM'sche Methode, nach der sich die meisten in den endokarditischen Auflagerungen vorkommenden Bakterien, so namentlich der Streptococcus und Staphylococcus pyogenes, sowie der FRAENKEL-WEICHSELBAUM'sche Pneumococcus färben.

Zur histologischen Untersuchung der endokarditischen Effloreszenzen färbt man mit Alaunkarmin oder mit Hämatoxylin und Karmin resp. Eosin; oft ist auch die WEIGERT'sche Fibrinfärbung (s. S. 74) am Platz.

Auch die polychrome Methylenblaufärbung (s. S. 157) leistet hier manchmal gute Dienste; ebenso die VAN GIESON'sche Methode.

Die großen Gefäße härtet man ebenfalls zweckmäßig in MÜLLER'scher Flüssigkeit; auch Formalin gibt gute Resultate. Zur Untersuchung der arteriosklerotischen Veränderungen, namentlich in frischeren Stadien, kommt die FLEMMING'sche Härtungsflüssigkeit (s. S. 19) oder diejenige von MARCHI (s. S. 202) zur Anwendung. Zur Darstellung der elastischen Fasern dienen die S. 69 angegebenen Methoden.

## Milz, Knochenmark und Lymphdrüsen.

Als Härtungsmittel sind zu empfehlen Formol-MÜLLER, Formalin und Sublimat. Mit Vorteil kann man sich nach dem Vorgang von FOÀ auch einer Lösung von 2 g Sublimat in 100 g fast zum Sieden erhitzter MÜLLER'scher Flüssigkeit bedienen. Ebenso ist die ZENKER'sche Härtungsflüssigkeit (s. S. 18) empfehlenswert.

HEINZ (Zieglers Beiträge Bd. 29) empfiehlt Fixierung des Knochenmarks entweder in 10-proz. Formol, oder in 10—15-proz. Formol in 0,6-proz. Kochsalzlösung, oder in einer Formol-Sublimat-Eisessig-Lösung. Man härtet 2—3 Stunden bei Körpertemperatur in einer vorgewärmten

Lösung von Formol 8 Proz., Sublimat 3,5 Proz., Eisessig 0,5 Proz. in 0,6-proz. Kochsalzlösung, wäscht 24 Stunden in fließendem Wasser aus, und bettet nach Jodalkoholbehandlung zur Entfernung überschüssigen Sublimats in Paraffin ein.

Zur Färbung dienen die Kernfärbemittel, daneben kommen aber auch die von Ehrlich für die Blutuntersuchung angegebenen Färbungen (s. S. 147) in Betracht; ebenso die Färbung von Romanowsky-Ziemann (s. S. 151), Schridde (s. S. 156), Zieler (s. S. 156).

Reticulum und Bindegewebe kann man nach Mallory (s. S. 67) und den anderen Methoden für collagene Fasern darstellen.

Zur Färbung der eosinophilen Zellen empfiehlt Wolff eine 10 bis 15 Minuten lange Vorfärbung in wässeriger konzentrierter Orangelösung.

Isolierte Zellen des fixierten Knochenmarks kann man nach Arnold gut untersuchen, wenn man dünne Celloidinschnitte auf dem Objektträger mit Nelkenöl von Celloidin befreit, mit Kanadabalsam bedeckt und durch leichten Druck mit dem Deckgläschen die Zellen isoliert. Oder man bringt kleine Stückchen auf 6 Stunden in 1-proz. Osmiumsäure und zerschüttelt sie in Ehrlich's Hämatoxylin-Eosin.

Knochenmark gewinnt man derart, daß man einen langen Röhrenknochen aufmeißelt oder mit einer Knochenschere eröffnet und mit dem Skalpell einen Würfel entnimmt, Härtung in den oben empfohlenen Fixierungsflüssigkeiten. Färbung mit den für das Blut angegebenen Methoden.

Man kann aber auch die Knochenmarkflüssigkeit nach der Deckglastrockenmethode untersuchen (s. Blut), indem man einen markhaltigen, namentlich spongiösen Knochen auf dem Schraubstock auspreßt.

Fixation in der Hitze oder bei starkem Fettgehalt besser in Alkohol-Äther.

Schließlich kann man auch die Markhöhle anbohren, ein feines Kapillarröhrchen einstoßen und den in dem Röhrchen aufsteigenden Marksaft auf das Deckglas bringen, oder auf Deetjen'schem Agar (s. S. 144) untersuchen; das Bohrloch kann man am lebenden Tier mit Wachs oder Paraffin verschließen.

Um Milzpulpa ganz frisch zu untersuchen, empfiehlt Ehrlich, sofort nach dem Tode mit einem dicken Troikart durch die Haut durch in die Milz einzustechen und den so erhaltenen Saft auf dem Deckglas auszustreichen.

Osteoklasten und Osteoblasten färben sich mit basischen Anilinfarben intensiv.

## Seröse Häute.

Für dieselben kommen die Härtungen in Formol-Müller oder Alkohol und Formalin und als Färbung die gewöhnlichen Kernfärbemittel zur Anwendung.

Um seröse Häute (Meningen, Peritoneum) in ausgebreitetem Zustande zu fixieren, spannt man sie über ein Glasgefäß, z. B. ein Uhrschälchen, und bringt sie so in die Fixierungsflüssigkeit. Über Darstellung der Endothelien und ihrer Zellgrenzen s. S. 67.

Seröse Trans- und Exsudate kann man, wenn sie zellreich sind, direkt im frischen Präparat mit Zusatz von etwas Kochsalzlösung unter-

suchen. Sind sie dagegen zellarm, so läßt man sie sedimentieren, was sich namentlich auch dann empfiehlt, wenn man auf Tuberkelbazillen oder andere Bakterien untersuchen will, oder man wendet das Zentrifugierungsverfahren an.

Entzündliche Auflagerungen werden nach vorhergehender sorgfältiger Celloidineinbettung mit Hämatoxylin-Eosin, nach der Weigert'schen Fibrinfärbungsmethode, vor allem auch nach van Gieson gefärbt, wobei es sich empfiehlt, den Fuchsingehalt der Färbeflüssigkeit zu variieren.

## Haut.

Die Haut wird in Müller-Formol, Alkohol oder Formalin gehärtet. Einbettung erfolgt am besten in Celloidin. Bei Paraffin muß der Aufenthalt in absol. Alkohol und Xylol möglichst kurz gewählt werden, da die Objekte sonst sehr spröde werden. Behandlung mit Zedernöl (s. S. 32) ist dabei empfehlenswert. Zur Färbung dient Hämatoxylin, Alaunkarmin, oder eine andere Kernfärbung, sowie die gewöhnlichen Doppelfärbungen und die van Gieson'sche Methode.

Die **Epithelfasern** werden mit der Weigert'schen Fibrinmethode oder deren Modifikation nach Beneke (s. S. 75) dargestellt. Vorbedingung sind sehr dünne Paraffinschnitte. Nach Kromayer (Modifikation von Fischel) verfährt man am besten folgendermaßen:

1) Die entparaffinierten Schnitte werden 10—15 Minuten in einer Mischung von Anilinwasser und konzentrierter Gentianaviolettlösung 6 B zu gleichen Teilen gefärbt.
2) Gründliches Auswaschen in Wasser.
3) 1—30 Sekunden in Lugol'scher Lösung.
4) Auswaschen in Wasser; vorsichtiges Abtrocknen mit faserfreiem Filtrierpapier, so daß eine Spur eines feuchten Glanzes zurückbleibt. (Cave vollständiges Abtrocknen!)
5) Differenzieren mit im Paraffinschrank erhitzten Anilinxylol (1 : 2, 1 : 3, 1 : 1, je nach Dicke der Schnitte, bis keine sichtbaren Wolken mehr abgehen.
6) Xylolübergießung.
7) Balsam.

Pasini's Epithelfaserfärbung:

1) Alkoholhärtung, nicht aufgeklebte Paraffin- oder Celloidinschnitte.
2) 10 Minuten in 2-proz. Lösung von Acidum phosphorowolframicum.
3) Kurzes Abspülen in destilliertem Wasser.
4) 15—20 Minuten in der Färbemischung:
   10 Tropfen Wasserblau-Orceinmischung (Grübler) + 12 Tropfen 2-proz. Eosin B. A. (Grübler), in Alkohol 50-proz. + 1 Tropfen gesättigte wässerige Säurefuchsinlösung + 5 Tropfen neutrales Glyzerin. (Die Unna'sche Wasserblau-Orceinmischung hat folgende Zusammensetzung: Wasserblau 1,0, Orcein 1,0, Essigsäure 5,0, Glyzerin 20,0, Alkohol 50,0, destilliertes Wasser 25,0.)
5) Abspülen in destilliertem Wasser.
6) Alkohol absolutus.

7) Abermaliges Eintauchen auf wenige Sekunden in die Phosphorwolframsäurelösung.
8) Absoluter Alkohol—Xylol—Kanadabalsam, Epithelfasern, Kerne, Keratohyalin rot, Protoplasma blau, Hornschicht gelblichrot.

Auch mit der SCHRIDDE'schen Modifikation der ALTMANN'schen Granulamethode (s. S. 65) werden die Epithelfasern gut dargestellt.

Über die Darstellung des Keratohyalins und Eleïdins s. S. 73, der collagenen Fasern s. S. 67, der elastischen Fasern s. S. 69, der Plasma- und Mastzellen s. S. 157, der epiphytischen Bakterien s. S. 135.

## Schleimhäute.

Härtung in Sublimat, Formalin oder in MÜLLER'scher Flüssigkeit; wenn es auf die Untersuchung des Epithels ankommt, so muß man das Material möglichst frisch in die Härtungsflüssigkeit bringen und vor dem Schneiden in Celloidin oder Paraffin einbetten. Einbettung ist auch nötig, wenn man Auflagerungen, mit denen die Schleimhaut bedeckt ist, untersuchen will.

Färbung mit den gewöhnlichen Kernfärbungsmitteln, Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Über Schleimfärbungen s. S. 76.

## Magen und Darm.

Zur Härtung dient hauptsächlich MÜLLER'sche Flüssigkeit, dann auch Sublimat (ZENKER'sche Flüssigkeit) und nach der Empfehlung von HEIDENHAIN Pikrinsäure. Formalin gibt ebenfalls gute Resultate. Auch bei der Magen- und Darmschleimhaut kommt es für feine Untersuchungen darauf an, daß man die zu untersuchenden Stücke möglichst bald in die Konservierungsflüssigkeit bringt. Beim Magen kann man dieser Forderung dadurch gerecht werden, daß man denselben bald nach dem Tode in der Leiche durch ein Gummirohr mit MÜLLER'scher Flüssigkeit oder mit Formalin oder mit der von ORTH empfohlenen Mischung von Formalin und MÜLLER'scher Flüssigkeit (s. S. 17) oder mit alkoholischer Sublimatlösung 2,5 auf 100 Alkohol (50-proz.) füllt.

Zur Anfertigung von Schnittpräparaten ist Celloidin- oder Paraffineinbettung zu empfehlen.

Als Färbemittel dienen die gewöhnlichen Kernfärbungen, auch Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Für manche Verhältnisse eignet sich sehr gut die von HEIDENHAIN empfohlene Färbung mit der BIONDI-HEIDENHAIN'schen Flüssigkeit (s. S. 57).

Auch die VAN GIESON'sche Färbung gibt meist gute Bilder.

Zur Differenzierung der Haupt- und Deckzellen in den Magendrüsen empfiehlt KOLSTER folgendes Verfahren: Härtung in beliebigen Härtungsflüssigkeiten, ausgenommen Osmiumsäure. Überfärben mit Hämatoxylin, Entfärben in 1-proz. Salzsäurespiritus bis zu schwach Rosafärbung, Neutralisation in 1-proz. Ammoniakalkohol, bis die Schnitte eine zarte Blaufärbung zeigen, Auswaschen in destilliertem Wasser, Färbung 1—5 Minuten lang in schwacher, wässeriger Säurefuchsinlösung, Auswaschen in destilliertem Wasser, Alkohol, Öl, Kanadabalsam. Haupt-

zellen hellblau mit dunkelblauem Kern, Deckzellen reine Fuchsinfärbung mit dunklem Kern.

Mit polychromem Methylenblau färben sich die Hauptzellen intensiv, während die Deckzellen ungefärbt bleiben.

Zur frischen Untersuchung des Magen- und Darminhalts ist es meist geboten, denselben in hinreichender Verdünnung unter das Mikroskop zu bringen. Man verfährt so, daß man mit einer feinen Platinöse eine minimale Menge von Darminhalt in einem Tropfen Wasser oder Kochsalzlösung auf dem Objektträger verteilt. Zur Trennung der verschiedenen Bestandteile der Fäzes bedient man sich passend der Zentrifuge.

Zur makroskopischen Prüfung und Auswahl der weiter zu untersuchenden Bestandteile verdünnt man den Darminhalt mit Wasser, breitet ihn in einer großen flachen Glasschale aus und läßt ihn durch leichte Neigung langsam auf dunklem Hintergrund abfließen.

Wenn der Magen- oder Darminhalt Blut beigemengt enthält, so sind oft in der schwarzen Masse wenigstens noch einzelne rote Blutkörperchen zu erkennen, welche die Diagnose sichern. Andernfalls muß man die Häminprobe anstellen (s. Kap. XV). Nach H. U. Kobert verfährt man am besten so, daß man den trockenen oder nötigenfalls getrockneten Kot mit schwefelsaurem Alkohol auszieht, den Auszug stark mit Wasser verdünnt, wobei das Hämatin ausfällt, dann entfettet man den Niederschlag mit Äther und erhitzt mit Eisessig.

Zum Nachweis sonstiger zelliger Bestandteile, Speisereste usw. bedarf es keiner besonderen Kunstgriffe. Amylumkörner werden durch die Jodreaktion nachgewiesen (s. S. 78). Zur Untersuchung auf Bakterien stellt man Deckglastrockenpräparate her. Als Färbemittel eignen sich für den Mageninhalt Bismarckbraun, welches die Sarcine und die verschiedenen Hefearten am deutlichsten färbt, für den Darminhalt die gebräuchlichen Lösungen von Anilinfarben. Auch bei der Untersuchung auf Bakterien muß der Darminhalt stark mit sterilisiertem Wasser verdünnt werden.

Zu bemerken ist, daß im Darminhalt eine Reihe von Bakterien vorkommen, die sich mit Jodjodkaliumlösung blau färben.

Will man den Darminhalt auf Cholerabakterien untersuchen, so kann man direkt Deckglastrockenpräparate färben. Besser aber ist das von Schottelius empfohlene Verfahren, den Darminhalt mit der gleichen Menge alkalischer Bouillon zu verdünnen und offen stehen zu lassen. Die Cholerabazillen entwickeln sich hauptsächlich an der Oberfläche, so daß Präparate, die von da entnommen sind, immer reichlich Kommabazillen enthalten.

Konkremente müssen sorgfältig eingebettet werden; meist bedarf es zur Anfertigung von nicht gar zu dünnen Schnittpräparaten keiner vorherigen Entkaltung.

## Leber.

Die Leber wird am besten in Müller'scher Flüssigkeit, Zenker-scher Flüssigkeit, Alkohol oder in Formalin gehärtet. Zum Nachweis degenerativer Veränderungen untersucht man die Leberzellen frisch in Abstrichpräparaten und setzt Essigsäure oder Osmiumsäure zu.

Zur Härtung wählt man, wenn es auf die Untersuchung degenerativer Veränderungen ankommt, Flemming'sche Lösung (s. S. 19) oder die Marchi'sche Mischung (s. S. 202.)

In Müller'scher Flüssigkeit gehärtete Präparate werden mit Alaunkarmin oder Hämatoxylin gefärbt; meist empfehlen sich Doppelfärbungen mit Hämatoxylin und Eosin.

Zur Konservierung des Gallenfarbstoffes bewährt sich besonders gut Sublimathärtung. Auch Formalin kann angewandt werden.

Melnikow-Raswedenkow empfiehlt zur Konservierung des Gallenfarbstoffes 10-proz. Formalinlösung, welcher 1-proz. Hydrochinon zugesetzt ist.

Zum Glykogennachweis Alkoholhärtung und Färbung nach den S. 85 angegebenen Methoden.

Tumoren bettet man am besten in Celloidin ein, da ihr Gewebe oft sehr leicht im Schnittpräparat ausfällt.

Darstellung der Gallenkapillaren nach Böhm.

1) Härtung höchstens 1 ccm großer Leberstückchen, 72 Stunden lang, in einer Mischung von

   3-proz. Kali bichromicum-Lösung 4 Volum.
   1-proz. Überosmiumsäure 1 „

2) Übertragen für 24—48 Stunden in 0,75-proz. Argentum nitricum-Lösung.
3) Auswaschen in destilliertem Wasser.
4) Nachhärten. Schneiden.

Die Gallenkapillaren erscheinen schwärzlich auf gelblichem Grunde gefärbt.

Auch mit der Modifikation der Weigert'schen Fibrinfärbung von Beneke (s. S. 75) lassen sich die Gallenkapillaren gut darstellen.

Jagić (Ziegler's Beiträge 33, 1903, S. 302) empfiehlt Färbung nach der Weigert'schen Neurogliamethode (s. S. 203), die auch für Gefrierschnitte verwendbar ist, wenn man sie 1 Stunde in $^1/_2$-proz. Chromsäurelösung beizt, und die Neurogliabeize dann 5—6 Stnnden einwirken läßt.

Nach Eppinger (Ziegler's Beiträge 31 und 33) erhält man die besten Bilder von den Gallenkapillaren durch eine Kombination der Weigert'schen Neuroglia- und Markscheidenmethode. Kleine Leberstückchen werden

1) 5—10 Tage in 10-proz. Formol gehärtet.
2) Direkt in Weigert'sche Neurogliabeize (s. S. 203) 10 Tage (im Brutschrank 5 Tage). Man kann auch von vornherein ein Gemisch von 11 Teilen Beize und 1 Teil reinem Formol anwenden.
3) Abspülen in Wasser. Einbetten in Celloidin.
4) Schnitte in 1-proz. wässeriges Hämatoxylin $^1/_4$—24 Stunden.
5) Kalt gesättigte, wässerige Kupferacetatlösung 5 Minuten.
6) Destilliertes Wasser 1—2 Tage.
7) Differenzieren in Weigert's Lösung, Ferricyankali 2,5, Borax 2,0, Wasser 300,0 im Verhältnis 1 : 9 bis 1 : 5 verdünnt.
8) Sorgfältiges Abspülen in destilliertem Wasser.

9) Auf einige Minuten in konzentrierte wässerige Lithionkarbonatlösung bis zur Entfärbung des Celloidins.
10) Wasser, Entwässern, Alkohol — Öl — Balsam.

Auch mittels der physiologischen Injektion von indigschwefelsaurem Natron (s. S. 28) kann man die Gallenkapillaren zur Anschauung bringen.

Darstellung des Faserwerks der Leber nach Böhm.

1) Härtung 1 ccm großes Leberstückchen in $^1/_2$-proz. Chromsäurelösung 48 Stunden lang.
2) Übertragen in 0,75-proz. Argentum nitricum-Lösung, 72 Stunden lang.
3) Einige Stunden lang in destilliertes Wasser.
4) Nachhärtung in Alkohol. Schneiden.

Die Fasern erscheinen schwarz.

Dieses Faserwerk läßt sich auch noch an in Alkohol gehärteten Präparaten darstellen nach der

Methode von Oppel.

1) Übertragen der Stückchen aus dem Alkohol in eine wässerige 10-proz. Lösung von Kalium chromicum flavum, 24 Stunden lang.
2) Übertragen in eine 0,75-proz. Argentum nitricum-Lösung. An Volumen muß die Flüssigkeit das 20—30fache des zu behandelnden Stückes betragen.
3) Wechseln der Argentum nitricum-Lösung nach 1 Stunde zum ersten, und nach 2—3 Stunden zum zweiten Male.
4) Nach 24 Stunden Abspülen in destilliertem Wasser.
5) Übertragen in Alkohol. Schneiden.

Am besten ist das Faserwerk nach der Methode von Maresch (s. S. 69) darstellbar.

Die Darstellung der Kupfer'schen Sternzellen ergibt nicht ganz konstante Resultate: frische Doppelmesser- oder Gefrierschnitte werden für 10 Minuten in ganz dünner Chromsäure ($^1/_{2000}$—$^1/_{10000}$) gebracht und dann in Goldchlorid 0,01 Proz. mit Zusatz von Formol 0,01 Proz. (oder offizinelle Salzsäure) im Dunkeln 36 Stunden lang. Nach Reduzierung in 0,1- bis 0,2-proz. Ameisensäure, Behandlung mit Alkohol — Öl — Balsam.

Beim Tier erhält man sie sehr schön mit der vitalen Lithionkarmininjektion von Ribbert (s. S. 14) oder durch Injektion von Argentum colloidale Credé (1 g in 5 ccm Wasser gelöst).

## Pankreas.

Härtung wie bei der Leber. Färbungen mit gewöhnlichen Kern- und Doppelfärbungen. Zur Darstellung der centroacinären Zellen empfiehlt sich Heidenhain's Eisenhämatoxylin oder Biondi-Färbung (s. S. 57).

Zur Färbung der Zymogenkörnchen dient die Methode von Galeotti. Fixierung in Flemming'scher oder Hermann'scher Flüssigkeit oder in gesättigter Sublimatlösung. Färben der sehr feinen Schnitte in gesättigter Lösung von saurem Fuchsin in Anilinwasser, Waschung in

fließendem Wasser. Übertragen in gesättigte Pikrinsäurelösung, der ein gleiches Volumen 75-proz. Alkohol zugefügt ist, Waschung in fließendem Wasser, Färbung in einer wässerig-alkoholischen Lösung von Methylgrün. Waschung in destilliertem Wasser, schnelle Entwässerung in Alkohol, Xylol, Balsam. Protoplasma grün, Sekretkörnchen, Nucleus und Nucleolus rot.

Über Pankreasfettnekrose s. S. 84 und 95.

## Harnapparat.

Härtung wie bei Leber und Pankreas; auch Sublimat gibt manchmal gute Härtung. Wenn man eiweißhaltige Flüssigkeit innerhalb der Glomeruluskapseln und Harnkanälchen fixieren will, so kann man die Kochmethode anwenden, indem man nicht zu große Stückchen für 1—2 Minuten in kochendes Wasser wirft und in starkem Spiritus nachhärtet. Denselben Zweck erreicht man noch besser durch Härtung in absolutem Alkohol und Celloidineinbettung. Zur Untersuchung auf degenerative Veränderungen kommen dieselben Methoden in Anwendung, wie bei der Leber (Flemming'sche Lösung und Methode von Marchi); für die feineren Untersuchungen ist Einbettung unerläßlich, weil sonst immer ein Teil des funktionierenden Parenchyms, namentlich in pathologisch veränderten Nieren, ausfällt. Doch geben auch Gefrierschnitte mit Sudan oder Scharlach sehr gute Bilder bei degenerativen Zuständen und bei Fettembolie. Färbung mit den kernfärbenden Mitteln. Für hyaline und amyloide Degeneration leistet die van Gieson'sche Methode Ausgezeichnetes.

Feinere Strukturen weist man mit der Eisenhämatoxylinmethode, der physiologischen Injektion, und den Granulafärbungen nach.

Kalkinfarkte werden mit den Kalknachweismethoden, Bilirubin- und Pigmentinfarkte am frischen oder fixierten Objekt dargestellt. Harnsäureablagerungen werden nach den S. 20 angegebenen Methoden fixiert. Zur mikroskopischen Untersuchung in Schnitten müssen wässerige Flüssigkeiten vermieden werden. Man fixiert in Aceton, bettet in Paraffin ein. Die Schnitte werden in Xylol von Paraffin befreit und mit alkoholischen Kernfarben gefärbt.

Die mikroskopische Untersuchung des **Harns** nimmt man in der Weise vor, daß man denselben sedimentieren läßt oder zentrifugiert und das Sediment, welches mit der Pipette entnommen wird, frisch auf dem Objektträger oder als Deckglastrockenpräparat untersucht. Letzteres namentlich dann, wenn die Untersuchung auf die Gegenwart von Bakterien gerichtet ist.

Tuberkelbazillen sind bei Tuberkulose des Harnapparates meist nur spärlich im Harn vorhanden. Man läßt deshalb am besten möglichst vollständig, 24 Stunden lang, sedimentieren und färbt gleich von vornherein eine größere Anzahl von Deckglastrockenpräparaten, etwa 6 bis 10 und mehr, nach den bekannten Methoden. Ebenso kann auch das Zentrifugierungsverfahren mit Nutzen in Anwendung gezogen werden. Die Methode ven Gabbet ist unzulänglich. Vor allem ist eine Verwechslung mit Smegmabazillen zu vermeiden. Das ist nur teilweise durch Entnahme des Harns mittels des Katheters möglich; es müssen die für die Differentialdiagnose gegenüber Smegmabazillen angegebenen

Färbungsmethoden (s. S. 126) angewandt werden. Eventuell Impfung oder Kulturverfahren.

Zur Untersuchung des Harns auf zellige Bestandteile ist es oft ratsam, das Sediment mit Wasser oder Kochsalzlösung zu verdünnen; Essigsäurezusatz läßt die Zellen schärfer hervortreten; ebenso kann man sich dieselben deutlicher zur Anschauung bringen, wenn man vom Rande des Deckglases einige Tropfen Löffler'scher Methylenblaulösung zufließen läßt.

Will man Präparate konservieren, so stellt man sie als Deckglastrockenpräparate her und färbt ebenfalls mit Löffler'schem Methylenblau oder mit Bismarckbraun.

Die Untersuchung auf Harnzylinder wird sehr erleichtert, wenn man das Sediment in ganz dünner Jodjodkaliumlösung, die eine weingelbe Farbe hat, suspendiert.

Blut im Harn läßt sich meist mikroskopisch direkt nachweisen, weil einzelne Blutkörperchen wenigstens so weit erhalten sind, daß sie eine Diagnose gestatten; außerdem kann man in zweifelhaften Fällen noch die Häminprobe (s. Kap. XV) anstellen.

Auf Fettgehalt des Sediments untersucht man, indem man dasselbe mit gleichen Volumina 96-proz. Spiritus und konzentrierter, scharlachroter Lösung von Sudan III (s. S. 82) in 96-proz. Spiritus zusetzt. Außerdem ist noch direkter Zusatz von Osmiumsäure (s. S. 12 und 18) anwendbar.

Auf kristallinische Beimengungen untersucht man das Sediment im frischen Präparat.

Bilirubin kommt amorph oder in gelblichen rhombischen Täfelchen vor.

Im sauren Urin kommen vor:

Das saure harnsaure Natron, welches in größerer Menge das sog. Ziegelsediment bildet, ist amorph.

Reine Harnsäure erscheint hauptsächlich in Wetzsteinform oder in rhombischen Tafeln oder in langen spitzen Formen.

Oxalsaurer Kalk bildet briefkuvertförmige Kristalle.

Cystin bildet regelmäßige sechseckige Tafeln, Tyrosin bildet Nadeln in Büschelform, Leucin kommt in Form von Kugeln vor.

Im alkalischen Harn finden sich:

Harnsaures Ammoniak kommt bei Zersetzung des Harns vor und bildet stechapfelförmige Kristalle.

Phosphorsaure Ammoniakmagnesia = Tripelphosphat erscheint in Sargdeckelform.

Kohlensaurer Kalk bildet Kugel- und Bisquitform.

Phosphorsaurer Kalk, amorph oder in keilförmigen Kristallen, oft zu Rosetten angeordnet.

## Nebennieren und chromaffines Gewebe.

Fixierung in Formalin, Sublimat oder Zenker'scher oder Müller-scher Flüssigkeit. Die Fett- und Myelintröpfchen der Rinde untersucht man frisch auf Doppelbrechung, an Gefrierschnitten mit Sudanfärbung. Für suprarenale Tumoren der Nebennieren und Nieren kommt Alkoholhärtung und Glykogenfärbung in Betracht.

Die chromaffinen Zellen in der Marksubstanz der Nebenniere und in den Paraganglien bedürfen zu ihrer guten Darstellung möglichst frische Fixierung in Flüssigkeiten, die Chromsäure oder ihre Salze enthalten. Dann färbt sich ihr Protoplasma gelbbraun. Müller'sche Flüssigkeit und Müller-Formol geben gute Resultate. Kernfärbung mit Hämatoxylin oder Karmin. Mit polychromem Methylenblau werden die chromaffinen Zellen grün.

Kohn fixiert in einer Mischung von 96 ccm einer 3,5-proz. Kaliumbichromatlösung und 10 ccm 40-proz. Formols. Zur guten Fixierung der übrigen Gewebe dient eine Mischung von 3,5 g Kaliumbichromat, 1 g Sublimat, 100 ccm Wasser und 5 ccm Eisessig oder eine Mischung von Zenker'scher Flüssigkeit (ohne Glaubersalz) und 3,5 Kaliumbichromatlösung zu gleichen Teilen. Doch treten die chromaffinen Zellen nicht so deutlich wie in der Kaliumbichromat-Formollösung hervor. Reine Zenker'sche Flüssigkeit gibt die chromaffine Reaktion nicht.

Wiesel empfiehlt folgendes Verfahren:

1) Fixierung 1—4 Tage in 10 Teilen 5-proz. Kaliumbichromat, 20 Teilen 10-proz. Formalin, 20 Teilen destilliertem Wassers.
2) Auf 1—2 Tage in 5-proz. Kaliumbichromatlösung.
3) Sehr gründliches Auswaschen in fließendem Wasser 24 Stunden. Alkohol von steigender Konzentration. Paraffin-Einbettung (Celloidin färbt sich zu stark mit).
4) Färbung der Schnitte 20 Minuten in 1-proz. wässeriger Toluidinblau- oder Wasserblaulösung.
5) 5 Minuten in Leitungswasser.
6) Färben 20 Minuten in 1-proz. wässeriger Safraninlösung.
7) Alkohol 96-proz. und absolutus, bis die blaue Farbe wiedererscheint.
8) Xylol — Balsam.

Chromaffine Zellen grün, die übrigen Zellen hellblau, Kerne rot.

## Schilddrüse, Epithelkörperchen, Hypophyse.

Fixierung in Formalin, Formol-Müller, Sublimat oder Alkohol. Einbettung in Paraffin oder Celloidin oder Gefrierschnitte. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, van Gieson, Eisen-Hämatoxylin nach Heidenhain (S. 52) oder nach Benda (S. 52). Die oxyphilen Zellen der Epithelkörperchen färben sich intensiv mit Eosin. Auch in der Hypophyse erlaubt Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine Unterscheidung in chromophobe und chromophile und unter den letzteren wieder in rote eosinophile und blaue cyanophile Zellen zu treffen. Zur feineren Untersuchung dient Benda's Eisenalizarin-Toluidinblaumethode (Berliner klin. Wochenschrift 1900).

## Respirationsapparat und Sputum.

Bronchialinhalt wird bei Verdacht auf Aspiration von Fruchtwasser, Meconium, Speisebrei usw. am besten im frischen Quetschpräparat untersucht. Bei fibrinöser Pneumonie zeigt ein Abstrich über die Schnittfläche die Fibrinpfröpfe. Fettembolie wird zweckmäßig so nachgewiesen, daß man mit einer kleinen gebogenen Schere von einer frischen

Schnittfläche ein Scheibchen abträgt und in Kochsalzlösung, ev. mit nachherigem Zusatz von Kalilauge untersucht. Für sonstige Untersuchungen am besten Fixierung in Müller'scher Flüssigkeit oder in Formalin, Alkoholhärtung dann, wenn man auf Fibrin oder auf Bakterien untersuchen will; jedoch kann man auch in diesen Fällen Formalinpräparate verwenden. Zur Fixierung von entzündlicher Ödemflüssigkeit eignet sich Kochen (S. 19) und nachfolgende Härtung in starkem Spiritus. In allen Fällen, in denen es sich um einen abnormen Inhalt in den Lungenalveolen handelt, ist die Celloidineinbettung angezeigt. Wenn man ganze Lungen oder größere Lungenstücke in toto härten will, so empfiehlt es sich sehr, die Bronchien mit der Härtungsflüssigkeit und später auch mit dünner Celloidinlösung vorsichtig zu injizieren.

Meist erhält man auch durch Formalinhärtung und Gefrierschnitte hinlängliche Präparate, die zum Studium der Verfettung bei Pneumonie oder der Fettembolie mit Osmium oder Sudan III behandelt werden können.

Färbung mit den gewöhnlichen kernfärbenden Mitteln; außerdem kommen die spezifischen Bakterienfärbungen und die Weigert'sche Fibrinfärbung (s. S. 74) in Betracht.

Sehr instruktiv ist die Färbung auf elastische Fasern (s. S. 69), indem dadurch oft die verdeckten früheren Alveolargrenzen sichtbar werden.

Das **Sputum** kann man unverdünnt oder mit Kochsalzlösung verdünnt frisch untersuchen; meist ist jedoch eine Verdünnung nicht notwendig. Bei der Untersuchung des Sputums muß man vor allen Dingen berücksichtigen, daß dasselbe zellige Beimengungen aus der Mund- und Rachenhöhle enthält, und daß ihm namentlich auch Speisereste beigemischt sein können.

Man kann das Sputum aber auch in Alkohol, Flemming'scher Lösung oder Sublimat härten und im Schnitt untersuchen. Bei dieser Methode werden die Zellen besser erhalten.

Außer Speichelkörperchen, Plattenepithelien der Mundhöhle, Rundzellen und Schleimzellen finden sich im Sputum oft auch große Zellen, die Epithelien ähnlich sind, aber eine mehr runde Form besitzen als diese. Sie haben einen großen bläschenförmigen Kern und sind wohl nicht in allen Fällen als desquamierte Alveolarepithelien aufzufassen. Sie enthalten oft Pigment. Sie kommen auch bei einfacher Bronchitis vor.

Pigment resp. Pigmentkörnchenzellen im Sputum können von Hämorrhagien herrühren, namentlich bei Stauungen im kleinen Kreislauf, die durch Insuffizienz der Mitralis bedingt sind = sog. Herzfehlerzellen (Eisenreaktion s. S. 90); es finden sich dann neben dem Pigment oft noch rote Blutkörperchen vor.

In den bei weitem meisten Fällen handelt es sich aber um Pigmentarten, welche mit der Atmungsluft in die Lungen eingedrungen sind.

Diese letzteren Pigmentarten geben — vorausgesetzt, daß es sich nicht um Siderosis handelt — keine Eisenreaktion mit Ferrocyankalium und Salzsäure (S. 90). Außerdem sind sie meist mehr schwarz gefärbt, während das Blutpigment einen braunroten Farbenton zeigt. Doch ist der Farbenunterschied allein nicht maßgebend.

Fibrinausgüsse der Bronchien sind schon makroskopisch an ihrer eigentümlichen Form zu erkennen.

Die sog. Asthmakristalle stellen lange, sehr spitzige Oktaeder dar.

Die Curschmann'schen Spiralen sind bandförmige, spiralig gewundene Gebilde, die in ihrem Zentrum einen helleren Faden zeigen. Fettsäure-Kristalle finden sich bei putrider Bronchitis, bei Lungengangrän, Lungenabszeß, auch bei Kavernenbildung.

Zum Nachweis der eosinophilen Zellen färbt man dünn ausgestrichene Deckglaspräparate 5 Minuten lang oder länger in 0,5-proz. spirituöser Eosinlösung, spült in 50-proz. Alkohol ab und färbt 2 Minuten lang in Methylenblau nach. Abspülen. Trocknen. Balsam.

In jedem Sputum finden sich Mikroorganismen der verschiedensten Art, die zum Teil aus der Mundhöhle stammen.

Sowohl die Tuberkelbazillen wie die elastischen Fasern finden sich vorzugsweise in kleinen, pfropfenartigen Bröckeln des Sputums, auf die man daher bei der Untersuchung vorzugsweise sein Augenmerk zu richten hat, wenn es sich um den Nachweis von Tuberkelbazillen oder von elastischen Fasern handelt (Sedimentierung des Sputums s. S. 123). Zur Untersuchung auf Bakterien kommt die Deckglastrockenmethode zur Anwendung. Auf elastische Fasern untersucht man entweder in der Weise, daß man zu dem frischen Sputumpräparat 1-proz. Kalilauge zutreten läßt, oder so, daß man das Sputum mit 10-proz. Kalilauge kocht, dann sedimentieren läßt und nach 12—24 Stunden das Sediment untersucht.

## Männlicher und weiblicher Geschlechtsapparat.

Härtung in Formalin, Müller'scher Flüssigkeit, Müller-Formol, Sublimatgemische. Einbettung in Paraffin oder Celloidin, sowie Gefrierschnitte. Färbung mit Kernfarben und Doppelfärbungen.

**Hoden:** Zum Studium der Spermatogenese empfiehlt sich Fixation in Flemming'scher (S. 19) oder Hermann'scher (S. 63) Flüssigkeit oder Sublimatgemische und Färbung mit Heidenhain's Eisenhaematoxylin (S. 52), Safranin (S. 57) oder den andern Methoden für Kernteilungsfiguren. Für das Bindegewebs- und Elasticagerüst wählt man van Gieson-Färbung mit Weigert's Elastinfärbung oder die Vierfachfärbung nach Fraenkel (S. 70). Untersuchung von Samenflecken s. S. 184.

**Curettement.** Am frischen Präparat kann man besonders Deciduafetzen und Placentarzotten erkennen. Bei Entfernung größerer Stücke kann man auch Gefrierschnitte anwenden. Im allgemeinen aber ist es sicherer einzubetten und zwar, wenn Eile vorhanden ist, in Paraffin. Hier leisten die Schnelleinbettungsmethoden (s. S. 30 u. 32) große Dienste. Sowohl bei Verdacht auf Carcinom wie auf Eireste ist es zweckmäßig, möglichst viel verschiedene Stückchen und Bröckel zusammen in einen Block einzuschmelzen. Man trifft dann leichter auf kleine pathologische Herde und hat mehr Wahrscheinlichkeit, die Abgrenzung von der Muscularis studieren zu können. Die Färbung wird für gewöhnlich mit Hämatoxylin-Eosin ausgeführt.

Vaginalsekret wird auf Bakterien und Schimmelpilze nach den allgemeinen Regeln untersucht.

## Knochensystem.

Knochen und Gelenke werden in Müller'scher Flüssigkeit, in Formalin oder Müller-Formol gehärtet; die Härtung in Alkohol liefert nicht so schöne Präparate. Ist eine Entkalkung nötig, so darf dieselbe erst nach vollendeter Härtung vorgenommen werden. Die in Müller-scher Flüssigkeit gehärteten Präparate werden zunächst gründlich ausgewässert, einige Tage in Alkohol gelegt und dann erst entkalkt. Die Entkalkungsmethoden s. S. 20.

Zur Einbettung empfiehlt sich vor allem Celloidin, da die bei Paraffineinbettung nötige Erwärmung gerade für den Knochen manche Nachteile mit sich bringt.

Färbung mit Hämatoxylin; in vielen Fällen ist die Doppelfärbung mit Hämatoxylin und neutralem Karmin oder auch Eosin zu empfehlen, dieselbe gibt sehr schöne Präparate und übersichtliche Bilder, weil das neutrale Karmin den entkalkten Knochen, sowie osteoides, noch nicht verkalktes Gewebe rot färbt. Es ist aber, wenn diese Reaktion eintreten soll, ganz besonders darauf zu achten, daß die in Hämatoxylin gefärbten Schnitte, nachdem sie ausgewaschen sind, noch 12—24 Stunden in Wasser liegen bleiben, bevor sie in die Karminlösung kommen.

Die Grundsubstanz des verkalkten Knorpels, dessen Kalksalze ausgezogen sind, färbt sich mit Hämatoxylin meist intensiv blauviolett.

Unverkalkter Knorpel ist in seinem Verhalten gegen neutrales Karmin und Hämatoxylin inkonstant, doch kann man sagen, daß ruhender Knorpel sich im allgemeinen besser mit Karmin, wuchernder und hypertrophischer Knorpel dagegen intensiver mit Hämatoxylin färbt.

Auch van Gieson'sche Färbung gibt sehr instruktive Bilder.

Röthig empfiehlt zur Färbung des Knorpels das Kresofuchsin. Die alkoholische Lösung dieses Farbstoffes färbt das elastische Gewebe tiefblau, dagegen Knorpel, Schleim und Hornsubstanz röthich, die wässerige Lösung läßt die elastischen Fasern ungefärbt, Knorpel, Schleim, Knochen und Kerne werden tiefrot.

Die spezielle Vorschrift ist folgende:

40 ccm einer Stammlösung von Kresofuchsin 0,5 g — Alkohol (95-proz.) 100 g — Salzsäure 3 g werden gemischt mit

| | |
|---|---|
| Alkohol (95-proz.) | 40 ccm |
| konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung mit 2 Teilen Wasser verdünnt | 32 Tropfen. |

Färben der beliebig gehärteten Schnitte 2 Stunden lang oder länger, Auswaschen in 95-proz. Alkohol — Übertragen für kurze Zeit in absoluten Alkohol — Xylol-Kanadabalsam. Grundierung am besten mit Orange G. Kernfärbung mit Lithionkarmin.

Die Zellen des Knochenmarks treten namentlich bei Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sehr scharf hervor.

Zum Studium der Ablagerungsverhältnisse der Knochensalze und zum Nachweise kalkloser Knochenpartien hat dann auch Pommer eine Methode angegeben, welche sich auf die Eigentümlichkeit der Müller-schen Flüssigkeit stützt, daß sie nicht nur bei länger dauernder Einwirkung auf die Knochen — durch ihre nur unvollständig entkalkenden sauren Salze — diese gut schneidbar macht, sondern hierbei auch den

Unterschied zwischen den kalkhaltigen und kalklosen Knochenpartien ausgeprägt und deutlich erhält, was bei in Säuren entkalkten Knochen nicht der Fall ist. Das Verfahren ist folgendes:

Die Knochen bleiben so lange in MÜLLER'scher Flüssigkeit, bis sie mit einem scharfen Rasiermesser eben gut schneidbar geworden sind.

Es hebt sich dann in den angefertigten Schnitten die verkalkte Knochensubstanz durch ihr homogenes Aussehen scharf von den kalklosen Knochenpartien ab, welch letztere auf das deutlichste ihre fibrilläre Struktur hervortreten lassen.

Durch Karmintinktion wird dann das Auffinden kleiner kalkloser Knochenteile sehr erleichtert, und die Schnitte gewinnen überhaupt an Übersichtlichkeit.

Zur Färbung von Knochen, die in Säuren, z. B. in der v. EBNER-schen Flüssigkeit, entkalkt sind, empfiehlt POMMER:

1) Dahlia in einer Lösung von 0,04 ‰ oder
2) Safranin 0,10—0,16 ‰ oder
3) Methylgrün 0,30 ‰ und mehr.

In 12—18 Stunden färben sich diejenigen Partien, die vor der Entkalkung kalkhaltig waren, ziemlich intensiv in einer der genannten Lösungen, und zwar mit Safranin oder Dahlia mehr als mit Methylgrün.

Die schon vor der Entkalkung kalklos gewesenen Partien bleiben dagegen vollständig farblos und kontrastieren so auf das deutlichste gegenüber den früher kalkhaltigen Teilen.

Der Einschluß erfolgt in Glyzerin, dem etwas Farbstoff zugesetzt ist.

Eine Färbung des Knochengewebes mit Safranin ist auch von SCHEFFER in der folgenden Weise empfohlen worden:

1) Entkalkung in Salpetersäure oder salzsäurehaltiger Kochsalzlösung.
2) Färbung in wässeriger Safraninlösung 1 : 2000, $^1/_2$—1 Stunde lang.
3) Abspülen in Wasser.
4) Übertragen in 0,1-proz. Sublimatlösung.
5) Glyzerinuntersuchung.

Ein Kontakt der Präparate mit Alkohol ist möglichst zu vermeiden. Will man deshalb die Schnitte als Dauerpräparate aufheben, so zieht man sie nach der Sublimatbehandlung nur flüchtig durch Alkohol und entfernt dann das Wasser zum größten Teil durch Aufdrücken von Fließpapier; der Rest wird durch langes Einlegen in Bergamottöl entfernt. Dann in Kanadabalsam.

An unentkalktem oder durch MÜLLER'sche Lösung unvollständig entkalktem Knochen kann man mit Argentum nitricum (s. S. 89) den Kalk zur Darstellung bringen. Nachfärbung in Alaunkarmin oder Hämatoxylin-Eosin.

Die **SHARPEY'schen Fasern** kann man an entkalkten Schnitten durch Behandlung mit 15-proz. Kochsalzlösung oder konzentrierter Salzsäure sichtbar machen.

Zur Färbung macht man nach KÖLLIKER die Schnitte zuerst in konzentrierter Essigsäure durchsichtig, und färbt sofort $^1/_4$—1 Minute lang in unverdünnter Lösung von Indigokarmin. Auswaschen in Wasser, Einbettung in Glyzerin.

Auch nach der modifizierten WEIGERT'schen Fibrinfärbungsmethode von BENEKE lassen sich die SHARPEY'schen Fasern darstellen.

Zur Darstellung der Gitterfiguren, sowie der Höhlen und Kanälchen des Knochens verfährt man nach von RECKLINGHAUSEN folgendermaßen:

Die Knochenschnitte werden mit Alaunlösung behandelt, z. B. durch Färben in einer stark alaunhaltigen Lösung von Alaunkarmin, und dann in Glyzerin oder Alaunglyzerin eingeschlossen. Auf diese Weise füllen sich die Kanälchen mit Kohlensäure, welche durch den säureartig wirkenden Alaun, oder auch durch saures Glyzerin aus dem kohlensauren Kalk des Knochens frei gemacht wird. Für Dauerpräparate kann man die glyzerindurchtränkten Schnitte im Zustande vollster Gasinjektion abtupfen und in Wasserglas einschließen.

Man kann aber die Kanälchen auch dadurch sichtbar machen, daß man sie mit einer Farbstofflösung füllt, z. B. nach der Methode von ZIMMERMANN: Dünne Schliffe werden in Xylol entfettet und gut getrocknet, in einer gesättigten alkoholischen Fuchsinlösung mehrere Minuten lang gekocht und dann zum Trocknen 2—3 Tage lang auf die beiden Schenkel einer Pincette derartig aufgelegt, daß beide Flächen noch mit Farbstofflösung bedeckt sind. Schließlich wird der überflüssige Farbstoff vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt, das Präparat noch einmal in Xylol geschliffen, abgepinselt und in Xylolkanadabalsam eingelegt.

Zu demselben Zwecke empfiehlt RUPPRECHT folgende Methode:

1) Abfeilen des völlig fettfreien Schnittes von gut mazeriertem Knochen auf 0,3 mm und Entfernen des etwa die Poren verstopfenden Feilstaubes mit dem Skalpell.
2) Einlegen einige Minuten in Äther, schnelles Erhitzen des Schnittes auf einer Glasplatte und Zurückbringen des noch heißen Schnittes in Äther.
3) Übertragen in konzentrierte, siedende, alkoholische Lösung von Diamantfuchsin und 5 Minuten langes Kochen. Dann Erkaltenlassen bis unter 34° C.
4) Farbbad bei 70° zur Trockne eindampfen und Entfernen des Farbstoffes von der Oberfläche mit dem Skalpell.
5) Schleifen (s. unten). Einbetten mit Kolophonium, welches in warmem, wasserfreiem Benzol gelöst ist.

In seltenen Fällen kann man sich zur Untersuchung pathologisch veränderter Knochen auch der **Schliffe** bedienen. Man stellt die Knochenschliffe in der Weise[1]) her, daß man die Stücke zunächst in konzentrierter Sublimatlösung fixiert, in Wasser auswäscht und in Alkohol nachhärtet. Dann wird das Stück durchfärbt (s. S. 61), kleine Stücke abgesägt und diese für 24 Stunden in sehr dicke Gummilösung und ebensolange in 96-proz. Alkohol gebracht. Das an der Luft getrocknete Stück wird dann zunächst auf der einen Seite mit immer feineren Feilen glatt geschliffen, mit der Schnittfläche auf eine Glasplatte mittels Gummilösung aufgeklebt und nun die andere Seite ebenfalls mit Feilen von zunehmender Feinheit geschliffen, bis der Schnitt durchsichtig ist.

Neuerdings hat ARNDT[2]) eine nach dem Prinzip des Doppelmessers konstruierte Präzisionssäge hergestellt, die dünne Knochenschnitte liefern soll.

RUPPRECHT empfiehlt folgendes Verfahren zur Anfertigung von Schliffen:

Knochenschnitte werden auf 0,3 mm abgefeilt; der trockene Schnitt wird zwischen zwei matten Glasplatten mit gewöhnlichem Bimsteinpulver geschliffen, welches reichlich und wiederholt mit einer Mischung von Benzin und Vaselinöl (10 : 1) übergossen wird. Dann wird der Schliff auf dem Trockenstein in Benzin und Vaselinöl mit den Fingern geglättet. Schließlich wird mit Benzin abgewaschen, getrocknet und zwischen Schreibpapier poliert.

---

[1]) Vgl. SCHAFFER: Artikel „Knochen und Zähne" in Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. Berlin-Wien 1903.

[2]) Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 1901.

## Darstellung der Knochenlakunen und ihrer Ausläufer am entkalkten Knochen nach Schmorl.

### I. Thionin-Pikrinsäuremethode.

1) Härtung in den gebräuchlichen Härtungsmitteln, ausgenommen in Sublimat, am besten in Müller'scher Flüssigkeit, Formalin oder Orth'scher Mischung. Beliebige Entkalkung.
2) Einbettung ausschließlich in Celloidin.
3) Übertragen der Schnitte in Wasser für mindestens 10 Minuten.
4) Färbung 5—10 Minuten oder länger in einer konzentrierten Lösung von Thionin in 50-proz. Alkohol 1 Teil auf 10 Teile Wasser, oder in Nicolle'scher Karbolthioninlösung (s. S. 101).
5) Abspülen in Wasser.
6) Übertragen in eine heiß gesättigte, nach dem Erkalten filtrierte wässerige Pikrinsäurelösung, $^1/_2$—1 Minute lang.
7) Abspülen in Wasser, Übertragen in 70-proz. Alkohol so lange, bis sich beim Hin- und Herbewegen der Schnitte keine größeren blaugrünen Farbwolken mehr ablösen, meist 5—10 Minuten lang.
8) Entwässern, Origanumöl oder Karbolxylol, Kanadabalsam.

Die Knochensubstanz ist gelb bis gelbbraun gefärbt, kalkhaltige intensiver gelb wie kalklose, die Zellen sind rot. Nur in der kalkhaltigen Knochensubstanz sind die Knochenhöhlen und ihre Ausläufer dunkelbraun bis schwarz, in der kalklosen Knochensubstanz treten sie nur dann hervor, wenn man mit alkalischer Thioninlösung färbt (auf 10 ccm Farblösung 1—2 Tropfen Liquor Ammon. caustic.). Es handelt sich nicht um eine eigentliche Färbung, sondern um einen feinen Farbstoffniederschlag. Dieser Niederschlag findet sich oft auch in anderen feinen Gewebsspalten; man kann ihn hier manchmal wenigstens teilweise beseitigen, wenn man die Schnitte nach der Pikrinsäurebehandlung für $^1/_2$ Stunde in Wasser zurückverbringt.

Diese Methode ist auch für Zähne geeignet.

Goetsch verwendet eine gesättigte Lösung von Neutralrot in 5-proz. Karbolwasser und eine Pikrinsäurelösung mit 0,1-proz. Sublimatzusatz. Event. Vorfärbung mit Hämatoxylin.

### II. Thionin-Phosphorwolframsäure-Methode.

1) Härtung dünner Knochenscheibchen 8 Wochen lang in Müller'scher Flüssigkeit; Abkürzung der Härtungszeit auf 4 Wochen bei Bruttemperatur ist möglich. Am besten Vorfixierung in Formalin.
2) Entkalken in Ebner's Entkalkungsflüssigkeit (s. S. 23).
3) Gründliches Auswässern in fließendem Wasser.
4) Härtung in Alkohol, Celloidineinbettung.
5) Übertragen der Schnitte in Wasser auf 10 Minuten.
6) Färbung in alkalischer Thioninlösung (auf 10 ccm obiger Farblösung 1—2 Tropfen Liquor Ammon. caust.) 3 Minuten lang oder in konzentrierter wässeriger Thioninlösung zur Hälfte mit Wasser verdünnt, 5 Minuten.
7) Übertragen, für wenige Sekunden oder auch länger, mit Glasnadeln, in konzentrierte wässerige Lösung von Phosphorwolframsäure oder (weniger empfehlenswert) Phosphormolybdänsäure.

8) Übertragen in Wasser, meist 5—10 Minuten lang, bis die graublauen oder grünblauen Schnitte himmelblau geworden sind.
9) Übertragen, 3—5 Minuten lang, in verdünnte Lösung von Liquor Ammon. caust. 1 : 10.
10) Übertragen in mehrmals zu wechselnden 90-proz. Spiritus.
11) Entwässern in 96-proz. Alkohol, Karbolxylol, Kanadabalsam.

Wenn die Schnitte überfärbt sind, behandelt man sie vor der Entwässerung 5 Minuten lang in Salzsäurespiritus und wäscht sie in Wasser aus.

Grenzscheiden schwarzblau, Knochengrundsubstanz hellblau, bezw. grünlichblau, zellige Elemente diffus blau. Bei Rachitis sind die Grenzscheiden nur in den kalkhaltigen Partien gefärbt.

Die Methode ist sehr zuverlässig und gibt sowohl bei erwachsenen wie bei kindlichen Knochen sehr klare Bilder. Auch die Zahnkanälchen lassen sich ausgezeichnet darstellen.

## Muskeln und Sehnen. Sehnenscheiden. Schleimbeutel.

Muskeln und Sehnen, sowie Sehnenscheiden und Schleimbeutel werden in Müller'scher Flüssigkeit oder in Formalin gehärtet. Die Schnitte von Muskeln lassen sich schlecht anfertigen, wenn man nicht in Celloidin einbettet. Färbung der Muskeln namentlich mit Hämatoxylin-Eosin, welch letzteres das Protoplasma deutlich rot färbt. Außerdem Pikrokarmin, Alaunkarmin. Auch Pikrinsäure (s. S. 60) eignet sich zu Doppelfärbungen. Gute Färbungen gibt auch die Eisenhämatoxylinmethode von Heidenhain, sowie die Neutralfärbungen von Heidenhain (s. Herz, S. 162).

Untersuchung der Muskeln auf Trichinen s. S. 137.

Uratablagerungen bei Gicht werden in wässerigen Flüssigkeiten gelöst; die Fixierung muß daher in Alkohol geschehen.

## Sehorgan.

Die Lider und die Konjunktiva werden nach den für die Haut geltenden Regeln behandelt. Die Bakterien des Konjunktivalsekretes stellt man nach den beschriebenen Methoden dar. Die Tränendrüsen untersucht man analog den Speicheldrüsen; ihr Fett wird durch Fixierung in Flemming'scher Flüssigkeit oder durch Sudanfärbung von Gefrierschnitten dargestellt.

Zur Untersuchung an frischem Material bedient man sich der Isolationsmethoden (S. 9). Meist aber wird Fixierung angewandt, und zwar, wenn irgend möglich, des ganzen unzerschnittenen Bulbus nach möglichst schonender Herausnahme. Als Fixierungsflüssigkeiten dienen Formalin, Müller'sche Flüssigkeit, Müller-Formol, Zenker'sche Mischung (besonders für die Netzhaut), Flemming'sche Lösung und Marchi's Fixierung. Man kann das Eindringen dadurch beschleunigen, daß man einige kleine Fenster in die Sklera schneidet. Bei dem am meisten angewandten Formalin ist die Härtung und Fixierung eines menschlichen Auges schon in 2—3 Tagen vollendet, aber ein längerer Aufenthalt in der Formollösung schadet nichts. Für die Härtung der Linse

ist Formalin weniger empfehlenswert. Die Aufbewahrung in Müller-scher Flüssigkeit ist sehr lange möglich.

Bevor das Auge der Einbettung unterworfen wird, muß es zerschnitten werden. Am besten bekommt man alle wichtigen Teile (Papille, Macula lutea) auf den Schnitt, wenn man nicht einfach halbiert, sondern durch 2 horizontale Schnitte 3 Teile herstellt, deren mittlerer dann die wichtigsten Teile enthält. Wegen der Härte der Linse drückt man am besten die Cornea fest auf eine Unterlage auf und beginnt am hinteren Umfange zu schneiden. Man kann auch das Auge durch einen Äquatorialschnitt in eine vordere und eine hintere Hälfte zerlegen. Für besondere Fälle, z. B. bei Tumoren muß die Schnittrichtung dem einzelnen Falle angepaßt werden.

Zur Einbettung ganzer Bulbusscheiben ist Celloidin empfehlenswert, für kleinere Stücke kann auch Paraffin verwandt werden. Die Härtung und Entwässerung in Alkohol muß möglichst langsam vorgenommen werden, da nur so störende Schrumpfung vermieden werden kann. Man bringt die Stücke zuerst in 33-proz., nach einigen Tagen in 50, 70, 90 und schließlich absoluten Alkohol. Auch die Celloidineinbettung muß langsam vorgenommen werden, damit die Konsistenz möglichst gleichmäßig wird. Für Celloidinschnitte vom ganzen Bulbus haben die Tauchmikrotome Vorteile.

Als Übersichtsfärbungen eignen sich Alaunkarmin, Hämatoxylin-Eosin, van Gieson und Heidenhain's Eisenhämatoxylin. Für die Untersuchung der Cornea kann man die Goldmethode von Cohnheim anwenden. Die dem eben getöteten Tiere entnommene Cornea wird für 5 Minuten in frisch ausgepreßten und filtrierten Zitronensaft, dann auf 20 Minuten in 1-proz. Goldlösung übertragen und schließlich unter dem Einfluß des Lichts 3—4 Tage lang in Wasser, welches durch Essigsäure ganz leicht angesäuert ist, gehalten. Geschnitten wird in Alkohol.

Für die Sklera ist oft Darstellung der elastischen Fasern vorteilhaft.

Das Pigment der Chorioidea wird durch Einlegen in Wasserstoffsuperoxyd gebleicht, im Dunkeln langsam und schonend, im Hellen schneller (2—3 Tage). Auch die Methoden mit Kalium permanganicum und Oxalsäure, sowie mit Chlorwasser sind empfehlenswert (s. S. 94). Nach Schreiber und Schneider werden mit der Levaditi'schen Versilberungsmethode (S. 133) auch farblose Vorstufen, vielleicht auch Abbauprodukte des Pigments geschwärzt. (Münchener medizin. Wochenschrift 1908, Nr. 37.)

Zur Isolierung der Elemente der Kristalllinse empfiehlt Gebhardt Härtung des ganzen Bulbus 2 Tage lang in 4—10-proz. Formalin; dann Übertragen für einige Stunden in 50—60-proz. Alkohol, Herausnahme und Sprengung der Linse, Zerzupfen in Wasser oder Glyzerin, wobei sich die Fasern ihrer ganzen Länge nach isolieren lassen.

Die Retina und der N. opticus werden mit den Methoden, die für das Zentralnervensystem angegeben sind, behandelt. Für die Retina sind neben den Achsenzylinder- und Markscheidenfärbungen auch die Methode von Golgi und die der Methylenblaufärbung, letztere mit der für Membranen angegebenen Modifikation (S. 208) zu empfehlen. Zur vergleichenden Untersuchung der belichteten und unbelichteten Netzhaut hat sich Birnbacher (v. Graefe's Archiv, Bd. XL. 1894) mit Vorteil

der Methode von Biondi-Heidenhain (s. S. 57) bedient. In der belichteten Retina werden die Zapfen grün, in der unbelichteten gelb. In manchen Fällen sind Doppelfärbungen sehr zu empfehlen.

### Gehörorgan.

Man nimmt an der Leiche das ganze Felsenbein heraus, eventuell nachdem man von der Carotis oder der Tuba Eustachii Fixierungsflüssigkeit injiziert hat. Nach vorsichtiger Entfernung der Dura bringt man das Felsenbein in Formalin, Müller'sche Flüssigkeit oder Müller-Formol. Sehr empfohlen wird die Methode von Wittmaack. Man bringt das ganze Felsenbein in etwa 500 ccm frisch bereiteter Lösung von Kalium bichromicum 5,0, Formalin 10,0, Aqu. dest. 85,0, Eisessig 3,0. In dieser Lösung muß das Felsenbein 6—8 Wochen im Brntofen verbleiben, ohne daß die Lösung gewechselt wird. Dann wird 24 Stunden lang ausgewaschen, das Objekt zerkleinert und in Formalin 10,0, Eisessig 3,0—5,0, Aqu. dest. ad 100,0 für 1—4 Wochen, je nach Größe des Objekts unter häufigem Wechseln der Flüssigkeit übertragen. Über die als praktisch erprobten Methoden der Zerkleinerung des Felsenbeines, s. die Zusammenstellung von Seligmann (die Vorbereitung des Gehörorgans für die mikroskopisch-pathologische Untersuchung, Frankfurter Zeitschrift für Pathologie I, 2. 1907) oder Politzer, Die Zergliederung des Gehörorgans, Stuttgart 1889.

Erst nach vollkommener Fixation darf die Entkalkung vorgenommen werden. Man wählt dazu täglich erneuerte 10-proz. wässerige Salpetersäure oder 3—5-proz. Trichloressigsäure. Nach 1—2tägigem Auswaschen in fließendem Wasser bringt man das Objekt für 2 Tage in 70-proz. Alkohol. Erst jetzt eröffnet man nach Seligmann den oberen Bogengang und die Schnecke. Nach je 2tägigem Verweilen in 85-proz., 96-proz., absolutem Alkohol und Alkohol-Äther erfolgt 14tägiges Einlegen in dünne und dicke Celloidinlösung.

Zur Färbung dienen die gebräuchlichen Kern- und Doppelfärbungen; für die Nervenendigungen kommen die Golgi'sche und die Methylenblaumethode (s. Nervensystem) in Betracht.

---

Fünfzehntes Kapitel.

## Mikroskopische Untersuchungen zu gerichtlichen Zwecken.

### Untersuchung von Blutspuren.

Handelt es sich um die Frage, ob irgendwie zur Untersuchung kommende Flecke auf Holz- und Metallgegenständen, auf Kleiderstoffen usw. von Blut herrühren, so hat man sein Augenmerk zu richten entweder

A. auf den Nachweis der Blutkörperchen selbst mit ihrer charakteristischen Form oder

B. auf den Nachweis des Blutfarbstoffes.

A. Will man in noch frischen Flecken Blutkörperchen nachweisen, so genügt es, etwas von dem abgeschabten Fleck in 0,6-proz. Kochsalzlösung — destilliertes Wasser ist zu vermeiden — aufzuweichen und direkt unter dem Mikroskop zu untersuchen.

Da die Blutkörperchen des Menschen und der Säugetiere rund und kernlos, die der übrigen Tiere aber oval und kernhaltig sind, so gestattet eine derartige Untersuchung auch die Beantwortung der Frage, ob die betreffende Blutspur vom Menschen resp. Säugetier oder von einer anderen Tierart stammt.

Die menschlichen Blutkörperchen sind größer als die der Säugetiere. Sie haben einen Durchmesser von 0,0077 mm; am nächsten stehen ihnen in der Größe die des Hundes, dann folgen Kaninchen, Schwein, Rind, Pferd, Katze und schließlich Schaf. Hinsichtlich der Form ist zu bemerken, daß die Blutkörperchen durch gegenseitige Abplattung mancherlei Formveränderungen eingehen können, daß in den Randpartien aber oft ganz gut erhaltene Elemente zu finden sind. Schnell eingetrocknete Blutkörperchen bewahren ihre Form besser.

Messungen mit dem Mikrometer, die jedoch, um ein sicheres Resultat zu erhalten, an möglichst vielen Blutkörperchen vorgenommen werden müssen, gestatten dann einen Wahrscheinlichkeitsschluß, ob die gefundenen Blutkörperchen menschlichem Blut entstammen oder nicht. Eine sichere Entscheidung ist nicht möglich, weil die Blutkörperchen sehr rasch Veränderungen in ihrer Größe und Form eingehen. Sind die Blutspuren älter, so kann man ebenfalls oft noch Blutkörperchen in ihnen nachweisen, die in ihrer charakteristischen Form erhalten sind.

Es genügt aber dann zum Nachweis gewöhnlich nicht die einfache Kochsalzlösung, sondern man muß andere Zusatzflüssigkeiten verwenden. Unter diesen empfiehlt sich:

1) Die 30-proz. Kalilauge, bei deren Anwendung man sich vor einer Verdünnung mit Wasser sorgfältig zu hüten hat.
2) Flüssigkeit von Roussin:

| | |
|---|---|
| Glyzerin | 3 Teile |
| konz. Schwefelsäure | 1 Teil. |

3) Modifizierte Pacini'sche Flüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Sublimat | 1,0 |
| Kochsalz | 2,0 |
| Glyzerin | 100,0 |
| Wasser | 300,0. |

Man verfährt bei der Anwendung dieser Flüssigkeit ebenfalls so, daß man von dem betreffenden Fleck etwas abschabt, oder wenn es sich um Flecken auf Kleidern, Stoffen usw. handelt, etwas davon zerzupft und entweder in der betreffenden Flüssigkeit auf den Objektträger bringt oder die betreffende Zusatzflüssigkeit erst unter dem Mikroskop zusetzt. In letzterem Falle beobachtet man direkt unter dem Mikroskop das Sichtbarwerden der Blutkörperchen, weil dieselben nach und nach durch die Einweichungsflüssigkeiten verändert werden.

Auf Größenunterschiede der Blutkörperchen läßt sich natürlich bei alten Blutspuren, wo die Blutkörperchen noch viel mehr ge-

schrumpft sind, viel weniger geben als bei der Untersuchung frischer Blutflecken.

Zu hüten hat man sich besonders vor der Verwechslung mit den Sporen einiger Schimmelpilzarten. Diese letzteren sind aber sehr resistent gegen Säuren und Alkalien.

B. Viel sicherer ist der Nachweis des Blutfarbstoffes durch Darstellung der Häminkristalle.

Das Hämin oder salzsaure Hämatin ist ein Derivat des Hämoglobins. Nach ihrem ersten Entdecker bezeichnet man die Häminkristalle auch als Teichmann'sche Blutkristalle.

Zu ihrer Darstellung aus eingetrocknetem Blut verfährt man folgendermaßen:

Befinden sich die Flecken auf harten Gegenständen, z. B. Holz, so werden sie sorgfältig abgeschabt und die braunrote Masse auf einem Objektträger oder in einem flachen Uhrschälchen gesammelt und in einer geringen Menge destillierten Wassers aufgelöst.

Von Flecken in Leinwand oder anderen Stoffen schneidet man besser kleine Stückchen aus, legt sie auf Objektträger und zieht mit wenig destilliertem Wasser aus.

Nach Entfernung der ausgezogenen oder ausgepreßten Gewebsstücke sowie etwaiger Verunreinigungen läßt man das mehr oder weniger rot gefärbte Wasser eintrocknen, setzt dann ein stecknadelkopfgroßes Tröpfchen 0,6-proz. Kochsalzlösung zu, breitet es über die Oberfläche aus und läßt wieder eintrocknen. Ist dies geschehen, so kratzt man die ausgetrocknete Masse mit einem Skalpell etwas auf und trägt mit einem Glasstab reinen Eisessig — bei verdünnter Essigsäure gelingt die Probe nicht sicher — auf, deckt mit einem Deckgläschen zu und erwärmt über einer Spiritusflamme, bis der Eisessig Blasen bildet. Durch fortgesetztes gelindes Erwärmen wird danach der Eisessig verdampft, und es scheiden sich bei seiner Verflüchtigung die braunen Häminkristalle aus. Je langsamer das Verdampfen des Eisessigs vor sich geht, desto größer werden die Häminkristalle. Es empfiehlt sich daher, das Verdampfen unter dem Deckglase zu bewirken.

Nach Strygowski und H. U. Kobert gelingt die Reaktion noch erheblich leichter, wenn man statt des Chlornatriums Jodnatrium in derselben Menge zusetzt; die erhaltenen Kristalle haben eine mehr schwärzliche Farbe. Man kann so noch 0,025 mg Blut = 0,002—0,003 Hämoglobin nachweisen. Daher gelingt auch der Nachweis in den Exkrementen von Wanzen, Flöhen und Fliegen, von denen die letzteren übrigens nicht regelmäßig Hämatin im Kote haben.

Die Häminkristalle sind in Wasser vollständig unlöslich, ebenso in Äther und Alkohol. Sie sind schwer löslich in Ammoniak, verdünnter Schwefelsäure und in Salpetersäure, leicht löslich in Kalilauge. Sie stellen größere und kleinere rhombische Täfelchen dar, entweder vereinzelt oder zu Zwillingen und Mehrlingen verbunden. In unvollkommen ausgebildetem Zustande erscheinen sie als hanfsamenförmige Kristalle von brauner bis braunschwarzer Farbe.

Erst die Kristallform zusammen mit der eigentümlichen Farbe sichert die Diagnose. Dagegen gestattet weder die Kristallform noch die Größe der Kristalle eine Differentialdiagnose zwischen Menschen- und Tierblut.

Es gibt eine Reihe von Momenten, welche den Eintritt der Reaktion beeinträchtigen, in selteneren Fällen auch unmöglich machen können. Nach Lewin und Rosenstein sind hier als praktisch wichtig zu nennen:

1) Längerer Kontakt des Blutes mit Schwefelwasserstoff (Fäulnis!) kann die Reaktion erschweren oder unmöglich machen. Eindampfen bis zur Trockne ist ebenfalls hinderlich. Hämatinhaltiges Blut gibt oft die Reaktion nicht. Hämochromogen, durch Reduktion von Hämatin entstanden, liefert keine Häminkristalle, Hämatoporphyrin ebenfalls nicht.

2) Längerer Kontakt des Blutes mit Ferrum pulveratum und Ferrum reductum hebt die Reaktion auf. Eisenrost (Instrumente!) kann die Reaktion schon nach wenigen Tagen unmöglich machen. Dieselbe Wirkung haben: Ferrum oxychloratum und Eisenschlorid, während basisches Eisenacetat die Reaktion nur erschwert und Ferrum jodatum, F. carbonicum saccharatum und F. citricum fuscum keine hemmende Wirkung haben.

3) Der Kontakt mit Blei-, Silber- und Qecksilbersalzen ist hinderlich, ebenso mit Ätzkalk, während Kupfersalze nicht hindern.

4) Kontakt mit Kohle, Sand und Ton hindert die Reaktion.

5) Fett soll, entgegen vielfach herrschender anderer Meinung, die Bildung der Häminkristalle nicht hindern. Ebenso ist auch längere Berührung des Blutes mit Gerbsäure nicht hinderlich. Aus Blut, das auf Eichenrinde gestrichen war, konnten L. und R. noch nach 4 Wochen die Kristalle in typischer Form darstellen.

C. Auch mit dem Spektroskop oder Mikrospektroskop kann Blutfarbstoff nachgewiesen werden.

D. In neuerer Zeit haben die Untersuchungen der spezifischen Hämolysine und Präzipitine auch eine forensisch-praktische Bedeutung zu erhalten, indem sie unter Umständen einen Beweis gestatten, ob das fragliche Blut oder andere Eiweißkörper von einem Menschen — oder von welcher Tierspezies stammt. Das Prinzip besteht darin, daß in dem Serum eines mit menschlichem Blut oder Eiweißstoffen vorbehandelten Versuchstieres Stoffe auftreten, die eine streng spezifische hämolytische oder präzipitierende Wirkung nur auf menschliches Blut oder Eiweiß ausüben. Auch die Methode der Komplementablenkung kann für den diagnostischen Nachweis gebraucht werden.

## Untersuchung der Haare.

Bei der gerichtsärztlichen Untersuchung von Haaren kann es sich zunächst um die Frage handeln, ob die vorliegenden Haare vom Menschen oder vom Tiere stammen.

Für die differentielle Diagnose ist mikroskopisch folgendes maßgebend:

1) Die äußerste Schicht des Haares, die Cuticula, besteht aus feinen Epidermisschuppen, die dachziegelartig übereinander liegen und mit ihren Spitzen alle nach dem freien Ende des Haares sehen. Wenn man diese Zellen nicht ohne weiteres deutlich sehen kann, so setzt man verdünnte Salpetersäure zu. Bei den meisten Tieren sind die Zellen der Cuticula viel größer als beim Menschen, so daß sie viel

deutlicher hervortreten. Außerdem stehen die Cuticulaschuppen bei vielen Tieren viel mehr ab und geben daher dem Haare ein ausgesprochener gezähntes Aussehen als beim Menschen.

2) Die mittlere Schicht oder die Rindensubstanz besteht aus langgestreckten Hornzellen. Man kann dieselben durch Zusatz von verdünnter Salpetersäure ebenfalls deutlicher hervortreten lassen.

Die Rindensubstanz prävaliert beim Menschen an Breite sehr gegenüber der innersten Schicht der Marksubstanz; beim Tier findet gerade das umgekehrte Verhalten statt.

3) Die zellige Struktur der Marksubstanz ist beim Menschen nur sehr undeutlich, beim Tiere dagegen sehr in die Augen fallend.

Beim Menschen fehlt die Marksubstanz häufig, namentlich auf einzelne Strecken, beim Tiere nur sehr selten, und dann immer nur an ganz vereinzelten Haaren. Selbstverständlich muß man das Haar in seiner ganzen Länge untersuchen.

Für die Entscheidung der Frage, ob Haare vom Menschen oder Tiere stammen, empfiehlt es sich in jedem einzelnen Falle, zum Vergleich sowohl menschliche Haare wie solche von den gewöhnlichen in Betracht kommenden Tierarten zu untersuchen.

Bezüglich der Körperstelle, von der zur Untersuchung kommende Haare stammen, ist zu bemerken, daß Barthaare am dicksten zu sein pflegen, mit 0,14—0,15 mm im Durchmesser, dann folgen der Reihe nach die weiblichen Schamhaare, die Haare der Augenlider, die männlichen Schamhaare, die männlichen Kopfhaare und schließlich die weiblichen Kopfhaare mit etwa 0,06 mm Durchmesser. Daß hierbei sehr beträchtliche individuelle Unterschiede vorkommen, darf bei der Untersuchung nie vergessen werden. Dazu kommen die sehr erheblichen Altersunterschiede, da die Haare der Neugeborenen bedeutend dünner sind als die älterer Kinder und namentlich von Erwachsenen.

Die Haare der Neugeborenen enden in einer Spitze. Ebenso sämtliche Haare, die in ihrem natürlichen Wachstum durch keine Insulte: Schneiden, Druck der Kleidung, Mazeration durch Schweiß usw. gestört wurden. Verschnittene Haare zeigen im Anfang eine scharfe, quere, später eine mehr abgerundete Trennung.

Ausgerissene Haare zeigen eine in der Regel nach unten offene, kolbige Wurzel, mit Resten des Haarbalges; ausgefallene Haare besitzen eine nach unten geschlossene, glatte, atrophische Wurzel.

Für die Frage, ob bestimmte Haare einem bestimmten Individuum entstammen, kommen namentlich Vergleichsuntersuchungen zur Anwendung, wobei auf die Dicke des ganzen Haares sowie seiner einzelnen Schichten, auf die Farbe usw. zu achten ist. Dabei kann es von Nutzen sein, die Form und Beschaffenheit der Querschnitte der zu untersuchenden Haare miteinander zu vergleichen. Solche Querschnitte kann man zwar auch so anfertigen, daß man auf einer festen Unterlage feine Schnitte mit dem Rasiermesser macht; viel empfehlenswerter ist aber die Einbettung in Paraffin (s. S. 30).

## Untersuchung von Samenflecken.

Als Vorprobe, ehe man auf Spermatozoen selbst untersucht, kann man Schüppchen von fraglichen Samenflecken auf dem Objektträger

aufweichen und die FLORENCE'sche Reaktion vornehmen. Man bringt zu der Aufweichungsflüssigkeit eine gleiche Menge von Jodjodkalilösung (Jod 1,65 — Jodkali 2,54 — Wasser 30). Namentlich da, wo die beiden Flüssigkeiten sich berühren, entstehen eigentümliche längliche rhombische Kristalle von verschiedener Größe, wenn es sich wirklich um menschliche Samenflecken handelt. Fäulnis behindert einesteils an den Flecken den Eintritt der Reaktion und kann sie möglicherweise an anderen Orten hervorrufen, ohne daß Samenflecken vorhanden sind.

Wenn es sich um die mikroskopische Untersuchung von Flecken auf das Vorhandensein von Spermatozoen handelt, so versucht man zunächst, ob sich von den auf ihrer Unterlage mehr oder weniger fest anhaftenden Flecken feine Schüppchen ablösen lassen. Derartige Schüppchen, die wegen ihrer Brüchigkeit vorsichtig behandelt werden müssen, werden dann auf dem Objektträger mit einem Tropfen destillierten Wassers aufgeweicht, wobei man die Verteilung dadurch beschleunigen kann, daß man die Schüppchen mit zwei Nadeln auseinanderzupft. Die Untersuchung geschieht mit starker Vergrößerung und enger Blendung.

Ist die Substanz aber in die Unterlage derartig eingesogen, daß eine Ablösung von einzelnen Schüppchen unmöglich ist, so schneidet man von der Unterlage ein klein Stückchen aus und weicht dasselbe in einem Uhrschälchen mit destilliertem Wasser $^1/_4$—2 Stunden lang auf. Hierbei wird ein Aufquellen der Spermatozoen verhindert, wenn man eine geringe Menge Salzsäure (1 Tropfen auf 40 ccm Wasser) zusetzt. Wenn man dann durch Aufdrücken eines Nadelstiels usw. das Gewebe auspreßt, so gibt dasselbe eine molkige Flüssigkeit ab, die direkt untersucht werden kann.

In diesem letzteren Falle kann man die Untersuchung auch sofort auf dem Objektträger vornehmen, indem man von dem betreffenden Stoff ein kleines Partikelchen in Wasser zerzupft; es ist aber auch bei dieser Untersuchungsmethode eine vorherige Aufweichung des Fleckes dringend zu empfehlen.

Das Auffinden der Spermatozoen kann man sich erleichtern, wenn man der Untersuchungsflüssigkeit etwas Neutralrotlösung zugibt, die die Köpfe rot färbt. Oder man schüttelt nach WEDERHAKE das Sediment einer Samenfleckaufschwemmung mit einem Tropfen Jodtinktur und setzt gleiche Mengen von filtrierter konzentrierter Croceïnscharlachlösung (Croceïnscharlach TB von Kalle & Co. in Biebrich) in 70-proz. Alkohol hinzu. Untersucht man das Sediment, ev. in Glyzerin, so treten die Spermatozoenköpfe deutlich gefärbt hervor.

Wenn man Spermatozoen gefunden hat, so kann man in der bekannten Weise Deckglastrockenpräparate herstellen und mit neutralem Karmin oder mit Fuchsin färben. Auch Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin gibt gute Bilder.

UNGER empfiehlt ganz besonders Färbung (1 bis mehrere Stunden lang, in folgender Färbungsflüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Methylgrün | 0,15—0,3 |
| Wasser | 100,0 |
| Salzsäure | 3 Tropfen. |

Diese Flüssigkeit kann einerseits als Erweichungsflüssigkeit für den zu prüfenden Stoff dienen; es wird dann direkt unter dem Mikro-

skop untersucht: sie kann anderseits aber auch noch zur Färbung der Deckglastrockenpräparate angewandt werden. Der hintere Teil des Kopfes wird intensiv dunkelgrün, der vordere Teil hellgrün, das Mittelstück und der Schwanz heller als das hintere Kopfstück.

### Untersuchung von Deciduaresten.

Da die Decidua graviditatis durch ihre großen, polygonalen oder mehr rundlichen Zellen sich von allen sonst in Betracht kommenden Gewebsbestandteilen in charakteristischer Weise unterscheidet, so kann ihre Untersuchung bei Verdacht auf stattgehabten Abort notwendig werden.

Untersuchung s. S. 173.

---

Sechzehntes Kapitel.

## Über die Einsendung von Untersuchungspräparaten.

Leider werden eine große Anzahl von Präparaten zur pathologisch-histologischen oder bakteriologischen Untersuchung in wenig zweckmäßiger Weise eingesandt. Oft ist dadurch die Beurteilung sehr erschwert, manchmal sogar das Resultat in Frage gestellt. Es sollen daher einige der wichtigsten Regeln hier kurz angeführt werden, nach denen man sich am besten das Material von auswärts erbittet.

1) Da der Untersucher in den meisten Fällen ein Interesse daran hat, sich zwecks topographischer Orientierung die Stückchen zur Weiterbehandlung selbst herauszuschneiden, ist es meist zweckmäßig, ganze Organe sich schicken zu lassen. Sie werden dazu am besten in Leinwandlappen eingepackt und in Blechkästen oder gut schließenden Milchkannen versandt. Kleine Stücke werden am besten zuerst in Guttapercha, Billrothbattist usw. eingewickelt und mit Lappen umhüllt. Die direkte Einwicklung in Gaze oder Watte verändert die Oberfläche und erschwert dadurch die Beurteilung.

2) Besteht die Befürchtung, daß bei dem Transport die Fäulnis zu stark fortschreitet, so werden am besten geeignete Stückchen sofort in Fixationsflüssigkeit gelegt und mitgeschickt. Sowohl für diese Fälle, wie besonders bei eiligen Untersuchungen von operativem Material ist 4-proz. Formalinlösung (die käufliche 40-proz. 10fach verdünnt) dringend zu empfehlen. Dem häufig verwandten Alkohol gegenüber hat sie den Vorzug, daß die Stückchen sofort auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden können. Außerdem wird das Fett in ihr konserviert, wie sich überhaupt an Formolpräparaten die meisten feineren Untersuchungsmethoden ausführen lassen. Unbedingt verwerflich sind die in der Chirurgie gebrauchten Desinfektionsmittel, da sie die Gewebe zur Quellung bringen.

3) Sollen die eingesandten Präparate später noch zu Demonstrations- oder Sammlungszwecken dienen, so können sie ganz in Formol oder die erste Kaiserling'sche Lösung gelegt werden, nur darf die Flüssigkeit

nicht zu spärlich bemessen werden. Auch muß durch Watte, Gaze usw. gleich für richtige Lagerung gesorgt werden, da die Präparate nach der Fixierung starr werden.

4) Präparate, die der bakteriologischen Untersuchung dienen sollen, werden für Schnittfärbungen möglichst rasch in Formalin oder Alkohol gelegt. Außerdem sind oft frische Ausstrichpräparate erwünscht, die nach völliger Lufttrocknung in weiches Papier verpackt werden. Soll die bakteriologische Diagnose durch Kultur oder Tierversuch erhärtet werden, so ist natürlich steriles Auffangen in sterilen Gefäßen oder sterilem Verbandmaterial unbedingt erforderlich. Zur Versendung empfiehlt sich Verpackung in Eis, das mit einem schlechten Wärmeleiter (Stroh, Heu, Holzwolle) umgeben ist.

5) Zur Untersuchung auf Sperma schneidet man trockene Flecke auf Wäsche oder dergl. aus und sendet sie ein. Feuchtes Material kann man mit ganz sauberen Leinwandstückchen aufsaugen und trocknen lassen.

6) Jedes Präparat soll genau bezeichnet und von einem Bericht begleitet sein, der Name, Alter, Geschlecht des Patienten, eine kurze Anamnese und Angaben über Herkunft und Gewinnung des Objekts enthält.

Siebzehntes Kapitel.

# Die Untersuchung des Nervensystems.

Von Privatdozent Dr. **W. Spielmeyer,**
Assistent an der psychiatrischen Klinik in Freiburg i. Br.

Für eine exakte neurohistologische Untersuchung ist es notwendig

1) die Stücke möglichst lebenswarm in die Fixierungsflüssigkeiten zu legen, ohne sie vorher mit Wasser in Berührung zu bringen, und
2) die Elementarbestandteile des nervösen Gewebes in elektiver Weise färberisch darzustellen.

Zur Erfüllung der ersten Forderung ist es unerläßlich, die Sektion möglichst in den ersten Stunden nach dem Tode vorzunehmen; denn die Verfahren, welche eine Konservierung des Zentralorganes durch Injektion von Formalin in den Schädelraum, in den Spinalsack oder in die Carotiden bereits an der Leiche anstreben, sind für exakte Untersuchungen unzulänglich. Für die Fixierung der feineren nervösen Strukturen und der Glia muß die Konservierungsflüssigkeit die Organstücke innerhalb der ersten 24 Stunden post mortem durchdringen können. Deshalb verbietet sich die bisweilen geübte Formol-Konservierung des Gehirns in toto von selbst.

Die mit den gewöhnlichen Kern- und Doppelfärbungen hergestellten Präparate vom Nervensystem können in der Regel nur eine allgemeine Orientierung geben; die daran gewonnenen Übersichtsbilder müssen durch die elektiven Färbemethoden in ihre einzelnen Komponenten zerlegt werden. Die für pathologisch-anatomische Zwecke wichtigsten **Elektivmethoden,** die in jedem Falle zur Anwendung kommen sollten, sind:

I. zur Darstellung der **Nervenzellen:** die Nissl'sche Färbung (am einfachsten in der Form der Alkohol-Toluidinblau-Methode),
II. zur Darsellung der **fibrillären Strukturen** der Nervenzelle und des **Achsenzylinders:** die Bielschowsky'sche Silberimprägnation am Gefrierschnitt,

III. zur Darstellung der **markhaltigen Nervenfasern:**
   a) die Weigert'sche Markscheidenfärbung (am sichersten in der Modifikation von Kulschitzky-Wolters): zum Nachweis alter Faserausfälle und zur Darstellung des Markfasergehaltes überhaupt,
   b) die Marchi'sche Chromosmiummethode: zum Nachweis frischer Markfaser-Degenerationen,

IV. zur Darstellung der **Neuroglia:**
   a) die Weigert'sche Gliamethode für die faserige Glia,
   b) die Nissl'sche Alkohol-Seifenmethylenblau- (Toluidinblau-) Methode für die protoplasmatische Glia.

Da die Vorbehandlung für diese verschiedenen Elektivfärbungen nicht die gleiche ist, so müssen die in kleine Stücke zerlegten Organteile von vorneherein in diejenigen Fixierungsflüssigkeiten gebracht werden, welche das betreffende Verfahren verlangt; nämlich

I. in 10—12-proz. **Formol:** zwecks Darstellung der Achsenzylinder und der Neurofibrillen (nach Bielschowsky), der Neuroglia (nach Weigert), der Markscheiden (mit nachfolgender Schnellbeizung nach Weigert),
II. in 96-proz. **Alkohol:** zwecks Darstellung der Ganglienzellen (Granulafärbung nach Nissl),
III. in **Müller'sche Flüssigkeit:** zwecks Darstellung der Markscheiden (nach Weigert) und der frischen Markfaserdegenerationen (nach Marchi).

Man ersieht aus dieser Übersicht, daß die Formolfixierung die Ausführung eines großen Teiles der eben angeführten Elektivmethoden gestattet. Zur Not ist auch die Nissl'sche und die Marchi'sche Methode noch am formolfixierten Material anwendbar; aber die Resultate der Methoden und ihre Beurteilung ist dann viel unsicherer (das Methylenblaubild z. B. ist dann kein Äquivalentbild mehr s. u.) Es muß deshalb im Gegensatz zu der häufig gegebenen Anweisung, auch für diese beiden Methoden die Formolfixierung zu verwenden, dringend geraten werden, wenn irgend möglich auch hier die Stücke primär in 96-proz. Alkohol bezw. in Müller'sche Flüssigkeit zu legen. Allerdings läßt das so fixierte Material dann eine elektive und kunstgerechte Darstellung anderer nervöser Gewebsbestandteile meist nicht mehr zu; so ist eine Markscheidenfärbung an Alkoholstücken ausgeschlossen, ebenso wie die Nissl-Färbung an Chrompräparaten usw.

Aus diesen Gründen ist die Frage, in welcher Weise bei bestimmten krankhaften Prozessen die Gewebsstücke fixiert werden sollen, nicht immer leicht zu beantworten, da es einer gewissen neuropathologischen Erfahrung bedarf, um zu entscheiden, ob es im gegebenen Falle mehr auf eine Darstellung der Nervenzellen oder des Markzerfalles oder der Neuroglia etc. ankommen wird, und wo wir etwa vorwiegend Veränderungen im Markfasergehalt oder an der protoplasmatischen Neuroglia zu erwarten haben. Diese Schwierigkeiten werden sich jedoch auf Grund einiger neuropathologischer Kenntnisse in der Regel bald überwinden lassen, auch dort, wo es sich um herdförmige Prozesse (Erweichungen, Tumoren, Kernerkrankungen o. ä.) handelt. Bei diffusen oder doch weit

ausgebreiteten zentralen Erkrankungen (Paralyse, Tabes, multipler Sklerose usw.) liegen die Dinge viel einfacher; es empfiehlt sich da, in den einzelnen Fällen immer wieder bestimmte Hirnregionen einer Untersuchung nach den verschiedenen Elektivmethoden zu unterziehen, vor allem die oberste Frontalwindung, die beiden Zentralwindungen, die erste Temporalwindung, die Gegend der Fissura calcarina, Ammonshorn, Kleinhirn, Hirnstamm; vom Rückenmarke sind Stücke aus den verschiedenen Höhen, zumal aus der Hals- und Lendenanschwellung und aus dem unteren Dorsalmark, einzulegen. Von jedem dieser zentralen Abschnitte müssen also jedesmal drei verschiedene Stücke in die drei für die verschiedenen Elektivfärbungen notwendigen Fixierungsflüssigkeiten gebracht werden, also in 10-proz. Formalin, in 96-proz. Alkohol und in Müller'sche Flüssigkeit.

In Formalin sind die Stücke wohl unbegrenzt haltbar. Der 96-proz. Alkohol muß zumal anfangs häufig gewechselt und in großen Quantitäten verwendet werden; die Konsistenz der Alkoholstücke nimmt im Laufe der Zeit ab. In Müller'scher Flüssigkeit werden die Gewebsstücke, wenn sie länger als 1 Jahr darin sind, oft sehr hart, spröde und brüchig; es empfiehlt sich, die Müller'sche Flüssigkeit bei alten Präparaten nur in halber Konzentration anzuwenden; anfangs ist häufiges Wechseln nötig.

## Untersuchung des Zentralnervensystems.

In der nachfolgenden Beschreibung verschiedener Färbemethoden für das Nervensystem sind nur die wichtigsten und die für histopathologische Zwecke bewährtesten ausgewählt. Von einer Übersicht über die jetzt in der Nervenhistologie und -histopathologie gebräuchlichen Methoden konnte schon deshalb abgesehen werden, als ja eine solche bereits in der bekannten „Färbetechnik" von B. Pollack (S. Karger 1905), wie in dem Buche von Bayon (A. Stuber, Würzburg 1905) existiert.

In erster Linie aber glaubte ich dem Zwecke dieser „Technik der histologischen Untersuchung pathologisch-anatomischer Präparate" Rechnung zu tragen, wenn ich auf die Aufzählung der zahlreichen und vielfach nebensächlichen Methoden und Modifikationen von vorneherein verzichtete, um eben wirklich nur das praktisch Brauchbarste zu bringen. Aus diesem Grunde mußte auch von der Beschreibung einzelner für die normale Nervenhistologie grundlegender Methoden, wie der Bethe'schen Fibrillenmethode, der Held'schen Alsol-Hämatoxylinfärbung usw. Abstand genommen werden, da eben diesen Methoden die für histopathologische Zwecke notwendige Sicherheit nicht zukommt.

### A. Übersichtsbilder.

Die besten Übersichtsbilder über das zentrale Nervensystem im gesunden und kranken Zustande geben Färbungen mit alten Karminpräparaten an in Müller'scher Flüssigkeit fixiertem Material. Leider sind die von der modernen Industrie hergestellten Karmine sehr unzuverlässig und die Resultate der Karminfärbung sind nur zu oft recht

unzulänglich, so daß man mehr und mehr von den Karminfärbungen abgekommen ist. Die besten Resultate geben noch

### I. Die Färbung mit Ammoniakkarmin.

Verwendung ausgereifter Lösungen, die vor dem Gebrauche stark verdünnt werden; 12—24stündige Färbung der an uneingebettetem Material erhaltenen Schnitte. Celloidinschnitte kommen vor der Färbung für einige Stunden in $^1/_2$—1-proz. Chromsäure (Schwalbe).

### II. Die Färbung mit Urankarmin nach Schmaus.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit (nicht auswaschen!).
2) Nachhärtung in absolutem Alkohol, im Dunklen.
3) Färben in einer durch halbstündiges Kochen hergestellten und nach dem Erkalten filtrierten Lösung von

| | |
|---|---|
| Karminsaurem Natron | 1,0 |
| Uranum nitricum | 0,5 |
| verrieben und gelöst in Wasser | 100,0. |

4) Auswaschen in Wasser usw.

Nach Chilesotti kann man die Färbung mit obiger Urankarminlösung durch Zusatz von 2 Tropfen 1-proz. salzsauren Alkohols pro ccm, den man erst kurz vor dem Gebrauch vornehmen muß, weit sicherer gestalten. Man kann dann jede Fixierung und Einbettung, auch Gefrierschnitte verwenden und färbt 10 Minuten bis 4 Stunden.

### III. Die Färbung mit Borax- oder Lithionkarmin

mit nachfolgender Behandlung in salzsaurem Spiritus (s. S. 54).

In Karminpräparaten sind die Achsenzylinder intensiv rot gefärbt, die Markscheiden bleiben hell und glänzend, so daß die sog. Sonnenbildchen am gelungenen Präparate entstehen; gefärbt sind außerdem das gliöse Zwischengewebe, sowie die Ganglienzellen und die Kerne.

Gute Übersichtsbilder gibt ferner die einfache und sicher arbeitende

### IV. Methode von Mallory,

welche die Achsenzylinder und die Neuroglia (s. dort) tiefblau färbt.

1) Färbung der Schnitte 20 Minuten bis 1 Stunde lang in einer einige Wochen lang dem Sonnenlichte ausgesetzten und vor dem Gebrauch filtrierten Lösung von

| | | |
|---|---|---|
| Phosphor-Molybdänsäure 10-proz. | 10 | Teile |
| Hämatoxylin | 1,75 | „ |
| Wasser | 200 | „ |
| Karbolsäure, kristallisiert | 5 | „ |

2) Auswaschen in 2—3mal gewechseltem 50-proz. Alkohol 5 bis 20 Minuten lang.
3) Entwässerung usw.

Die gefärbten Schnitte dürfen nicht zu lange in Alkohol absolut. verweilen. Die Färbekraft der Flüssigkeit nimmt mit der Zeit noch merklich zu, so daß man sie später mit destilliertem Wasser verdünnen kann.

V. Schließlich kann man sich einen Überblick über das Verhalten des zentralen Gewebes mit den gewöhnlichen Kernfärbungen, besonders mit der Heidenhain'schen Eisenhämatoxylinfärbung, oder mit vielen der in dem Hauptteil dieser Technik aufgeführten Doppelfärbungen verschaffen. Sehr gute Dienste leistet die Weigert-van Gieson'sche Methode (S. 61), bei welcher sich der Achsenzylinder rot, die Markscheide gelb, die Kerne schwarzbraun, die Glia gelblich, die Ganglienzellen blaßrot, das Bindegewebe leuchtend rot färben. Diese Methode darf demnach als eine Art „Universalfärbungsmethode" für das Nervensystem um so eher bezeichnet werden, als sie besser differenziert und zu viel sicheren Resultaten führt, wie die jetzt so unzuverlässig gewordenen Karminfärbungen. Die Färbung gelingt an Alkohol- und Formalinpräparaten und besonders schön an Müller-Präparaten, da hier die Differenzierung schärfer ist und die Gelbfärbung der Markscheiden besser hervortritt.

## B. Färbung der Ganglienzellen.

Zur Isolation der Ganglienzellen empfiehlt Arnold die von ihm angegebene Jodjodkalilösung, der man passend einige Tropfen wässeriger Eosinlösung zusetzen kann. Die Stückchen verweilen in der Flüssigkeit 5—6 Tage.

Hübsche Bilder gibt das von Kronthal angegebene, sehr einfache Verfahren der Färbung isolierter Nervenzellen. Man zerdrückt etwas graue Substanz der Hirnrinde oder des Rückenmarkes zwischen zwei Objektträgern und zieht dann die beiden Gläser, wie bei Bakterienfärbungen, von einander ab. Fixieren der Präparate über der Flamme oder besser in 96-proz. Alkohol. Färben am bequemsten in 1‰ Toluidinblaulösung, Abspülen, Abtrocknen, Balsam. Bei Überfärbung differenziere man in Alkohol.

Die Ganglienzellen werden mit ihren weithin zu verfolgenden Fortsätzen sehr übersichtlich zur Darstellung gebracht. Auch die Gliakerne, die Blutgefäße färben sich mit, stören aber bei einem gut über den Objektträger verteilten Präparat die Nervenzellfärbung nicht.

Weit über all den zahlreichen Methoden zur Darstellung der Nervenzellen steht ihrer histopathologischen Bedeutung und ihrer praktischen Brauchbarkeit nach

### I. Die Alkohol-Seifenmethylenblau-Färbung von Nissl.

Eine ausführliche Beschreibung seiner Methode hat der Autor in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, Berlin-Wien 1903, unter „Nervenzellen (pathologisch)" gegeben. Nur genaue Befolgung aller Regeln führt zu verwertbaren Resultaten.

Die Gewebsstücke dürfen nicht zu klein sein, mindestens 1 cm in allen Dimensionen; die möglichst lebensfrischen Stücke sollen ohne Berührung mit Wasser direkt in 96-proz. Alkohol kommen, dessen Menge etwa das 50—60fache betragen soll. Die Blöcke müssen auf allen Seiten von Alkohol umspült sein, und dieser bei eingetretener Trübung, spätestens aber nach 24 Stunden, gewechselt werden. Nach etwa 5 Tagen werden 6—8 mm hohe Blöcke mittels Gummi arabicum, der in 96-proz. Alkohol schnell erstarrt, aufgeklebt. Man schneidet 10—12 $\mu$

dicke Schnitte, die man aus dem 96-proz. Alkohol, völlig ausgebreitet, in folgende Farblösung bringt:

| | |
|---|---|
| Methylenblau B. Patent (von Carl Buchner u. Sohn, München) | 3,75 |
| Venetianische Seife (geschabt) | 1,75 |
| Destilliertes Wasser | 1000,0 |

Tüchtiges Umschütteln. Die Farblösung muß mindestens $^1/_4$ Jahr alt sein. Vor jedem Gebrauch schütteln und in ein Uhrschälchen filtrieren. Der Schnitt wird auf der Farblösung schwimmend erhalten und diese bis zum Aufsteigen des ersten Luftbläschens erwärmt. Nunmehr erfolgt die Differenzierung in

| | |
|---|---|
| Anilinöl, wasserhell (Höchster Farbwerke) | 10 Teile. |
| Alkohol, 96-proz. | 90 „ |

Die Differenzierungsflüssigkeit stelle man sich in kleinen Quantitäten jedesmal vor dem Gebrauch von neuem her. Der Schnitt bleibt hierin nur so lange, bis man ihn auf dem Spatel völlig ausgebreitet hat, dann überträgt man ihn auf den Objektträger, läßt die überflüssige Differenzierungsflüssigkeit ablaufen, trocknet mit Filtrierpapier und bedeckt schnell den Schnitt mit Cajeputöl. Man entfernt das überflüssige Öl, trocknet den Schnitt mit Filtrierpapier und spüle ihn unter sorgfältiger Vermeidung von Vertrocknung rasch mit Benzin ab. Dann träufelt man das überflüssige Benzin ab und bedeckt den noch nassen Schnitt sorgfältig überall mit Xylolkolophonium. Letzteres stellt man sich derart her, daß man ein 50 g fassendes Gläschen zur Hälfte mit gewöhnlichem Kolophonium, sodann ganz mit Xylol füllt, man läßt es offen unter einer Glasglocke stehen und benutzt die oberflächliche Schicht, die man abgießt. Zum Auflegen des Deckgläschens erwärmt man den Objektträger ganz leicht, bis das Xylolkolophonium dünnflüssig ist und wiederholt dies unter leichtem Druck auf das Deckglas nochmals, bis man kein Harz mehr herausdrücken kann. Die Präparate sind ca. $^1/_4$—$^1/_2$ Jahr haltbar, wenn sie vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Will man den Block aufheben, so muß man ihn von dem Kork oder dem Holz wieder lösen und in 96-proz. Alkohol bringen.

Kurz zusammengefaßt ist die Methode folgende:

1) Fixierung nicht zu kleiner Blöcke in 96-proz. Alkohol.
2) Schneiden des nicht eingebetteten Blocks.
3) Färben des schwimmenden Schnittes in der Seifen-Methylenblaulösung unter leichtem Erwärmen, bis die ersten Bläschen aufsteigen.
4) Ausbreiten auf den Spatel in der Differenzierungsflüssigkeit (Anilin-Alkohol).
5) Übertragen auf den Objektträger, Abtrocknen mit Fließpapier, rasches Bedecken mit Cajeputöl.
6) Entfernen des Öls mit Fließpapier (nicht eintrocknen lassen!), dann mit Benzin.
7) Abgießen des überflüssigen Benzins und Aufträufeln von Xylolkolophonium.
8) Auflegen des Deckglases unter leichtem mehrmaligem Erwärmen und vorsichtigem Druck auf das Deckglas.

Die Nissl'sche Färbung gibt nahezu immer absolut sichere Resultate; aber es ist notwendig, das von Nissl mit aller Exaktheit aus-

gearbeitete Verfahren auf das strengste innezuhalten. Man hüte sich vor allem dem häufig gemachten Vorschlage zu folgen und primär in Formalin zu fixieren oder gar das Material in Celloidin oder Paraffin einzubetten. Gewiß erhält man auch auf diesem Wege bisweilen gute Nervenzellbilder; aber die Resultate sind doch ganz unvergleichlich viel unsicherere und unzuverlässigere, als bei der Nissl'schen Methode, und vor allem haben die Bilder nicht den Wert von Nervenzelläquivalenten (s. darüber Nissl's Ausführungen). Schwierigkeiten, das in Alkohol gehärtete Material uneingebettet zu schneiden, bestehen übrigens keineswegs, man muß nur den Alkohol erstmals mindestens nach 24 Stunden und später alle 2—3 Tage (während der ersten 10 Tage) wechseln; auch sollte man die Stücke möglichst innerhalb der Zeit vom 5. bis zum 14. Tage nach dem Einlegen schneiden, später werden sie wieder etwas weicher, auch wenn man den Alkohol oft wechselt. Die Unterfläche des Blockes muß mit dem Rasiermesser glatt geschnitten und vor dem Aufkleben mit Fließpapier abgetrocknet werden. — Ein zu rasches Abblassen der Präparate läßt sich am ehesten vermeiden durch Aufbewahrung der Präparate im Dunkeln, durch sorgfältige Entfernung von Anilinöl und Cajeputöl, die oft in Schnitten zurückbleiben, und durch Benutzung eines rasch erstarrenden Einbettungsmediums.

Die Nissl'sche Methode bringt die Granulastruktur der Ganglienzellen und deren Abweichungen vom normalen Äquivalentbilde der Ganglienzelle in prägnanter Weise zur Anschauung; außerdem färbt sie die Gliazellen mit ihren protoplasmatischen Ausläufern (s. u.), die Zellkerne, sowie die chromophile Substanz der Plasmazellen.

Allerdings ist die Anwendung der Nissl'schen Methode dort, wo es darauf ankommt, zahlreiche Präparate von demselben Blocke anzufertigen (oder etwa Kurs-Präparate zu machen), dadurch etwas erschwert, daß jeder Schnitt einzeln gefärbt und differenziert werden muß. Aus praktischen Gründen wenden wir deshalb häufig die

## II. Alkohol-Toluidinblau-Färbung

an, bei der wir uns bezüglich Fixierung, Schneiden usw. streng nach Nissl's Vorschriften richten.

1) Die Schnitte kommen in flache Schalen mit wässeriger Toluidinblaulösung (1 : 2500), in welcher sie ca. $^1/_2$—1 Stunde gefärbt werden.
2) Auswaschen in destilliertem Wasser ca. $^1/_4$ Stunde lang.
3) Differenzieren in Alkohol von aufsteigender Konzentration.
4) Xylol, Xylolkolophonium.

Die Zellbilder sind sehr kontrastreich und klar, die Differenzierung der Granula scharf. Außer der Einfachheit hat diese Alkohol-Toluidinblau-Färbung noch den Vorzug, daß die Präparate viel weniger leicht abblassen als bei der Seifenmethylenblaufärbung und daß hier das Protoplasma der Plasmazellen metachromatisch violett gefärbt erscheint.

## III. Die Nervenzellfärbung mit Thionin.

Fixierung, Schneiden usw. wie bei Nissl's Verfahren. Färben in konzentrierter wässeriger Thioninlösung (5 Minuten), Differenzierung in Anilinöl-Alkohol (1:9) oder nur in Alkohol, Cajeputöl, Xylol, Xylolkolophonium.

Nach Lenhossék verfährt man bei der Thioninfärbung in der Weise, daß man die Gewebsstücke in 20-proz. Formalin oder in konzentrierter Sublimatlösung fixiert, mit Alkohol nachhärtet und in Paraffin einbettet. Färben, Differenzieren usw. wie oben.

## IV. Die Nervenzellfärbung nach Held.

bringt außer den Tigroidschollen noch die zwischen ihnen gelegenen, bei der Nissl'schen Methode ungefärbt bleibenden Protoplasmateile in einer roten Kontrastfarbe zur Anschauung.

1) Härtung in verschiedenen Fixierungsmitteln, am besten in Pikrinschwefelsäure; Nachhärtung in Alkohol.
2) Paraffin. Dünne Schnitte.
3) Färbung mit folgender leicht erwärmter Erythrosinlösung (2 Min.):

| | |
|---|---|
| Erythrosin pur. | 1,0 |
| Aq. destill. | 150,0 |
| Eisessig | 2 gtt. |

4) Abwaschen in Wasser; Nachfärben in einem Gemisch von wässerigem Azeton (1:20) und Nissl'scher Methylenblaulösung zu gleichen Teilen. Man färbt so lange unter Erwärmen, bis der Azetongeruch geschwunden ist.
5) Erkalten lassen; Differenzieren in 0,1-proz. Alaunlösung, bis der Schnitt wieder rötlich wird.
6) Abspülen, Alkohol, Xylol, Balsam.

V. Außer mit den spezifischen Ganglienzellfärbungen lassen sich mitunter auch brauchbare Nervenzellbilder gewinnen mit der Heidenhain'schen Eisenhämatoxylinfärbung, mit der Unna-Pappenheim'schen Methode zur Plasmazellenfärbung, mit polychromem Methylenblau, mit der Ehrlich'schen Triacidfärbung (Rosin), mit der Romanowsky-Ziemann'schen Färbung.

VI. Durch die vitale Methylenblaumethode können die Ganglienzellen des Zentralnervensystems ebenfalls dargestellt werden (s. u.).

VII. Bezüglich der Färbung der endozellulären Neurofibrillen s. d. nächsten Abschnitt (Bielschowsky's und Cajal's Silberimprägnation).

Die Golgi'schen Methoden zur Imprägnation der Ganglienzellen und ihrer Ausläufer sind, bei all ihrer Bedeutung für die normale Histologie, für pathologischeZwecke ungeeignet. Das liegt besonders an der Launenhaftigkeit der Methoden, welche ganz willkürlich diese oder jene Elemente zur Anschauung bringen und welche bald Gliazellen bald Nervenzellen imprägnieren; außerdem ergeben sich bei diesem Verfahren nur Silhouetten der weitverzweigten Zellkörper, während die feineren Strukturen in der Metallinkrustation verborgen bleiben. Da diese histologisch außerordentlich wichtigen Methoden jedoch einen guten Überblick über die Ausbreitungsweise der Nerven- und Gliazellfortsätze und über die nervöse Architektonik erlauben, sei hier wenigstens eine der jetzt am meisten gebrauchten Imprägnationsmethoden aufgeführt:

VIII. Die „schnelle" Golgi-(Cajal)sche Methode.

1) Härtung von kleinen, dünnen Stücken frischen Materials (am besten von jungen Tieren oder Embryonen) in einem Gemisch von

| | |
|---|---|
| 3-proz. Kal. bichrom.-Lösung | 4 Teile |
| 1-proz. Osmiumsäure-Lösung | 1 Teil |

2—8 Tage lang im Dunkeln.
2) Abspülen in destill. Wasser oder schon benutzter Silberlösung.
3) Übertragen in 0,6—1-proz. Höllensteinlösung für 2—6 Tage.
4) Schneiden zwischen Klemmleber oder rasches Nachhärten in Alkohol und sehr schnelles Einbetten in Celloidin (in höchstens 30 Minuten!).
5) Eintauchen der Schnitte in absolut. Alkohol, Bergamottöl, Balsam ohne Deckglas.

An den aus der Höllensteinlösung kommenden Stücken überzeugt man sich durch Einschneiden, ob die Chromsilberreaktion auch in das Innere gedrungen ist; sonst bringt man die Stücke noch einmal in das Chromosmiumgemisch (für 1—3 Tage) und danach wieder in die Argentum-nitricum-Lösung. Beide Metalllösungen sind in reichlichen Quantitäten zu verwenden. Am besten hängt man die Stücke an einem Faden auf oder legt sie in einen Fließpapierbrei.

Statt der Höllenstein- kann man sich auch einer Sublimatlösung bedienen; die Technik ist im Wesentlichen gleich.

## C. Färbung der Achsenzylinder und der Neurofibrillen.

Die wichtigste Methode ist hier für histopathologische Zwecke

### I. Die Silberimprägnation nach Bielschowsky.

1) Fixierung in 10—15-proz. Formalinlösung; frisches Material, 1 cm dicke Blöcke.

2) Herstellung von dünnen Gefrierschnitten nach vorherigem mehrstündigem Auswaschen in Wasser.

3) In destilliertem Wasser aufgefangen, werden die Gefrierschnitte mittels Glashäkchen für 24 Stunden in eine 2-proz. Argentum-nitricum-Lösung gebracht.

4) Durchziehen der Schnitte durch destilliertes Wasser und Übertragen in ammoniakalische Silberlösung, die man sich in der Weise herstellt, daß man von einer 10-proz. Höllensteinlösung 5 ccm nimmt und 5 Tropfen reine 40-proz. Natronlauge hinzufügt. Der dabei entstehende schwarzbraune Niederschlag wird durch tropfenweisen Zusatz von Ammoniak und unter beständigem Umschütteln (in dem verschließbaren ca. 25 ccm enthaltenden Meßzylinder) langsam zur Lösung gebracht. Danach wird die Lösung auf 20 ccm aufgefüllt. In der in ein Schälchen gegossenen ammoniakalischen Silberlösung bleiben die Schnitte 10—20 Minuten, je nach ihrer Dicke, bis sie einen tiefbraunen Ton angenommen haben.

5) Durchziehen durch destilliertes Wasser und Übertragen in eine 20-proz. mit Leitungswasser hergestellte Formalinlösung zur Reduktion (12—24 Stunden).

6) Auswaschen: Vergoldung in neutralem oder schwach saurem Goldbade : 2—3 Tropfen einer 1-proz. Goldchloridlösung auf 10 ccm Aqu. destill.; eventuell mit Zusatz von 2—3 Tropfen Eisessig. Dauer der Vergoldung ca. 30 Minuten, bis der Grundton rötlich violett ist.

7) Übertragen in 5-proz. Fixiernatronlösung zur Entfernung des ungenügend reduzierten Silbers ($^1/_2$ Minute); nach Verwendung saurer Goldbäder setzt man dem Fixiernatron noch etwas saures schwefelsaures Natron (1 Tropfen auf 10 ccm Lösung) zu.

8) Gründliches Auswaschen, Entwässern, Karbolxylol (1 : 10), Balsam.

Bei dieser Silberimprägnation mit nachträglicher Vergoldung bekommen die Achsenzylinder der markhaltigen und marklosen Nervenfasern und vor allem auch die endozellulären Neurofibrillen einen schönen schwarzen oder braunschwarzen Ton; sie treten außerordentlich scharf aus dem matt rötlichen oder violetten Grunde hervor. Die faserige Neuroglia bleibt ungefärbt (nur ausnahmsweise nimmt sie einen ähnlichen Ton an, wie die faserige nervöse Substanz). Bezüglich der Darstellung der peripheren Achsenzylinder und der Entfärbung der elastischen Lamellen usw. vgl. S. 208.

Die großen Vorzüge der Methode beruhen in ihrer Einfachheit und Sicherheit, welche sie für pathologische Zwecke (bei multipler Sklerose, Tumoren, Erweichungen, progressiver Paralyse, Idiotien usw.) ganz besonders geeignet erscheinen lassen. Die Imprägnation auch der feinsten marklosen Fasern und der Fibrillen in den Ganglienzellen ist in gelungenen Präparaten sehr vollständig und im ganzen Schnitte gleichmäßig.

Technisch wichtig ist, daß alle Übertragungen der Schnitte mit Glasinstrumenten vorgenommen werden müssen. (Am bequemsten scheinen uns dafür Glashäkchen zu sein, die wir uns durch Ausziehen einer Glasröhre und Umschmelzen des ausgezogenen dünnen Endes über dem Bunsenbrenner herstellen.) Bisweilen dürfte es nützlich sein, die Schnitte in Argentum-nitricum-Lösung länger als 24 Stunden (2 mal 24 Stunden) zu lassen oder auch die Lösung etwas konzentrierter (4-proz.) zu nehmen. Ein Überschuß von Ammoniak zu der ammoniakalischen Silberlösung ist zu vermeiden. Die Vergoldung wird oft gleichmäßiger, wenn man das Goldbad recht schwach (nur $^1/_2$ oder $^1/_3$ so stark wie oben angegeben) nimmt; dann braucht die Vergoldung 1—2 Stunden; zwischendurch empfiehlt es sich das Goldbad zu erneuern. Besonderes Gewicht ist natürlich auf dünne Schnitte zu legen.

Eine ausgezeichnete Fibrillen- und Achsenzylinderfärbung ist ferner die technisch noch einfachere

## II. Darstellung der Neurofibrillen nach Ramón y Cajal.

1) Frische, 3—4 mm dicke Stückchen werden für 4—5 Tage in eine 2—6-proz. Höllensteinlösung gelegt (bei Lichtabschluß [durch schwarzes Papier] im Brütofen).

2) Abspülen in destill. Wasser.

3) Übertragen für 24 Stunden zum Zwecke der Reduktion in eine 1-proz. Lösung von Pyrogallussäure, der man 5—10 Teile reines Formol zusetzt.

4) Nachhärtung in Alkohol, Paraffineinbettung, dünne Schnitte, Aufkleben.

5) Vergolden, Fixieren usw. wie bei der Bielschowsky'schen Methode (Bakay).

Diese Färbung ergibt zumal am Zentralorgan junger Tiere sehr klare Bilder. Ein Nachteil der Methode jedoch, welcher besonders ihre Brauchbarkeit für histopathologische Zwecke einschränkt, ist, daß die Imprägnation nur in einer mittleren Zone voll gelingt, während die äußeren Schichten des Blockes von Silberniederschlägen angefüllt und die innersten Schichten zu unvollständig versilbert sind.

### III. Die Silberfärbung der myelinfreien Achsenzylinder (und der Neurofibrillen) nach Cajal.

ist die für histopathologische Zwecke (multiple Sklerose usw.) wohl brauchbarste der verschiedenen vom Autor selber angegebenen Modifikationen der eigentlichen Fibrillenmethode.

1) Härtung dünner kleiner Stückchen 24 Stunden in

| | |
|---|---|
| Alkohol (96-proz.) | 100,0 |
| Ammoniak | 0,25—1,0 |

2) Auswaschen in mehrfach gewechseltem destilliertem Wasser.

3) Übertragen in die Silberlösung usw. wie bei der Fibrillenmethode.

Eine Vergoldung ist nur bei den zu hellen Schnitten notwendig.

Gegenüber diesen neuen Methoden zur Darstellung der Achsenzylinder werden die früher gebrauchten elektiven Achsenzylinderfärbungen nur noch wenig angewendet, da sie sehr viel unsicherer sind und meist nur den von den Markscheiden umschlossenen, nicht auch den nackten Achsenzylinder zur Anschauung bringen. Von diesen Methoden sei hier nur erwähnt

### IV. Die Kaplan'sche Achsenzylinderfärbung.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit (3 Monate und länger).
2) Alkoholnachhärtung, Celloidin- oder Paraffineinbettung.
3) Färbung in 10-proz. frischer Lösung von Anthracen-Eisengallustinte, 3 Tage lang im Brütofen.
4) Auswaschen in Wasser, Differenzieren nach Pal, eventuell mehrfach wiederholen (s. S. 200).
5) Abspülen in Wasser, Alkohol, Carbolxylol, Xylolbalsam.

V. Wo eine elektive Darstellung der Achsenzylinder nicht notwendig ist, erhält man brauchbare Achsenzylinderbilder auch mit den Karminmethoden, der Weigert-van Gieson'schen Färbung, der Mallory-schen Färbung (s. S. 191) der Färbung mit Nigrosin (s. S. 207) und ähnlichen Methoden, welche jedoch nur Übersichtsbilder liefern.

## D. Färbung der Markscheiden.

Härtung und Fixierung in Müller'scher Flüssigkeit oder in Formalin mit nachträglicher Chromierung (Schnellbeize).

### I. Die Weigert'sche Hämatoxylinfärbung der Markscheiden.

1) Nachhärtung der chromierten Stücke in Alkohol (ohne vorhergehendes Auswaschen in Wasser).

2) Celloidineinbettung.
3) Kupfern der Celloidinblöcke, am besten in der sog. Neurogliabeize (s. u.) 24 Stunden lang (= sekundäre Beizung).
4) Verweilen der Blöcke für einige Stunden in 70-proz. Alkohol.
5) Schneiden (nicht zu dünn! durchschnittlich 30 $\mu$ und darüber).
6) Färben 12—24 Stunden in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin | 1,0 |
| Alkohol absolut. | 10,0 |
| Sol. Lith. carbonic. | 1,0 |
| Aqu. destill. | 60,0 |

7) Abspülen in reichlichen Mengen von Wasser.
8) Differenzierung in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Borax | 4,0 |
| Rotes Blutlaugensalz (Ferricyankalium) | 5,0 |
| Aqu. destill. | 200,0 |

Entfärben bis die graue Substanz sich deutlich gelb abhebt.
9) Gründliches, mehrstündiges Auswaschen in Leitungswasser, eventuell mit Zusatz von Lithionlösung.
10) Entwässern in Alkohol.
11) Aufhellen in Karbolxylol (1 : 3) (s. S. 41)
12) Einlegen in Xylolkanadabalsam.

Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Stücke müssen noch braun sein, sie dürfen nicht schon in Alkohol grün geworden sein. Sonst überträgt man die Schnitte für einige Minuten oder auch für längere Zeit in eine $^1/_2$-proz. Chromsäurelösung, spült sie dann nur oberflächlich ab und bringt sie sofort in die Farbe.

Die für eine gute Markscheidenfärbung notwendige Härtung bezw. primäre Beizung dauert in Müller'scher Flüssigkeit für das Rückenmark etwa 3 Monate, für das Gehirn 5—6 Monate. Eine wesentliche Abkürzung des Verfahrens ist jedoch bei Anwendung der von Weigert angegebenen **Schnellbeize** möglich, die an dem in Formol fixierten Stücke vorgenommen wird und die nach 5 Tagen (im Brutofen) beendet ist. Zusammensetzung der Schnellbeize:

| | | |
|---|---|---|
| Doppeltchromsaures Kali | 5 | Teile |
| Fluorchrom | 2,5 | „ |
| Aqu. destill. (kochend!) | 100 | „ |

Die Stücke müssen dünn sein, da die Beize nicht tief eindringt; nach der Beizung gutes Auswaschen in 70-proz. Spiritus.

Statt des ganzen Blockes kann man auch erst die einzelnen Schnitte kupfern, was sich besonders dann empfehlen wird, wenn man noch andere Färbungen an dem gleichen Stücke ausführen will. (Das Kupfern mit der Neurogliabeize ist vorteilhafter als das mit einer Lösung von Cuprum aceticum oder als die doppelte Beizung in Cuprum aceticum-Seignettesalzlösung und Cuprum aceticum-Lösung, bei welch letzterer übrigens eine Differenzierung von dünnen Schnitten nicht notwendig ist.)

Die Farblösung muß vor dem Gebrauche frisch hergestellt werden aus zwei Stammlösungen:

I. 10-proz. Hämatoxylin-Lösung in absolutem Alkohol (muß mindestens $^1/_4$ Jahr alt sein) und
II. 1-proz. Lithion-Wasser.

An Stelle dieser Farblösung hat Weigert in den letzten Jahren einen Eisenhämatoxylinlack benutzt:

I. 4 ccm des officin. Liq. ferri sesquichlor. in 96 ccm Aqu. destill.
II. 10 ccm der gewöhnlichen 10-proz. alkohol. Hämatoxylinlösung in 90 ccm 96-proz. Alkohol.

Unmittelbar vor dem Gebrauche Vermischung gleicher Teile der Lösung I und II.

Es empfiehlt sich im allgemeinen, die Schnitte nicht vor 12 Stunden aus der Farbe zu nehmen; Hirnrindenstücke lasse man immer mindestens 24 Stunden darin, da die feinen supra- und intraradiären Faserzüge erst nach langem Verweilen im Hämatoxylin die Farbe festzuhalten vermögen. Manchmal ist es von Nutzen, die Entfärbung langsamer vorzunehmen, indem man die Blutlaugensalzlösung bis auf $^1/_2$ oder $^1/_4$ verdünnt.

Die Weigert'sche Methode gibt sehr klare Bilder, die Markscheiden sind tief blauschwarz gefärbt, sie heben sich prägnant ab von dem gelben Grunde, der in der grauen Substanz und in degenerierten Partien deutlich hervortritt. Ausfälle an Markfasern lassen sich, wenn sie einige Monate alt und nicht zu geringfügig sind, mit dieser Färbung exakt nachweisen; je mehr Nervenfasern zugrunde gegangen sind, desto mehr tritt der helle (gelbe) Untergrund hervor. Reste von Marksubstanz, die von frisch zerstörten Nervenfasern übrig geblieben und event. in Körnchenzellen aufgenommen sind, nehmen den Hämatoxylinlack oft auch noch an; ebenso rote Blutkörperchen und Pigment in den Ganglienzellen.

## II. Die Pal'sche Modifikation der Weigert'schen Färbung

bezweckt eine Entfärbung des im Weigert'schen Präparat gelb erscheinenden Grundes, welche durch eine andere Differenzierung erreicht wird. Die nicht gekupferten, in Weigert'scher Hämatoxylinlösung gefärbten Schnitte werden mindestens eine Stunde lang in Leitungswasser, dem Lithionlösung (im Verhältnis von 4 zu 150) zugesetzt ist, ausgewaschen und kommen dann

1) in eine $^1/_3$-proz. Lösung von übermangansaurem Kali 20—30 Sekunden lang, bis die graue Substanz braungelb aussieht.
2) Abspülen in Wasser.
3) Differenzieren in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Oxalsäure | 1,0 |
| Kalium sulfuros. | 1,0 |
| Aqu. destill. | 200,0 |

4) Gründliches Auswaschen in Leitungswasser, dem man etwas Salmiak zusetzen kann.
5) Alkohol, Xylol (oder Karbolxylol), Kanadabalsam.

Die Differenzierung geht hier rascher vor sich als bei der Weigert-schen Originalmethode und die Bilder erscheinen infolge der vollständigen Entfärbung des zwischen den Markfasern gelegenen Gewebes häufig noch eleganter, als bei jener Methode. Jedoch gibt letztere entschieden sicherere Resultate, als das Pal'sche Verfahren. Häufig geht die Differenzierung nicht gleichmäßig vor sich und es bleiben braune oder gelbe

Flecke zurück; es empfiehlt sich dann, die Schnitte nach kurzem Abspülen in Wasser in das übermangansaure Kali zurückzubringen und von neuem zu differenzieren; dann verschwinden fast immer (eventuell nach mehrmaligem Wiederholen dieser Prozedur) die gelben Flecke.

Nach Lissauer kann man die Färbung abkürzen, indem man die (nicht gekupferten) Schnitte zunächst in einer 1-proz. Chromsäurelösung (bis zum Aufsteigen von Blasen) erhitzt, dann abspült und sie in eine ebenfalls bis zum Aufsteigen von Blasen erwärmte Weigert'sche Hämatoxylinlösung überträgt.

Die wichtigste Modifikation der Weigert'schen Markscheidenfärbung ist die

### III. Methode von Kultschitzky, resp. von Kultschitzky-Wolters.

1) Härten in Müller'scher oder Erlicki'scher Flüssigkeit oder in Formalin mit nachträglicher Schnellbeize.
2) Einbetten in Celloidin, Schneiden.
3) Färben der Schnitte 12—24 Stunden lang in einem Gemisch von
   10-proz. Hämatoxylinlösung (in Alkoh. absol.) 10,0
   2-proz. Essigsäure 90,0
4) Direktes Übertragen in die Differenzierungsflüssigkeit
   Gesättigtes Lithionwasser 100,0
   1-proz. Lösung von rotem Blutlaugensalz 10,0
5) Gründliches Auswaschen in Leitungswasser.
6) Alkohol, Xylol, Balsam.

Die Differenzierung geht sehr langsam (mehrere Stunden) vor sich und läßt sich gut unter dem Mikroskop (Verhalten der feinen Markfasern der mittleren Rinde!) kontrollieren. Bei dem direkten Übertragen der Schnitte aus der Farbe in die Differenzierungsflüssigkeit wird diese alsbald dunkel; es empfiehlt sich, die Schnitte darin mindestens 1 Stunde zu lassen, da die Fasern dadurch einen besonders schönen blauschwarzen Ton bekommen. Danach wechsele man die Differenzierungsflüssigkeit ein- oder zweimal.

Diese Methode arbeitet außerordentlich sicher und bringt auch die feinen Markfasergeflechte der Rinde zur Anschauung; zum Nachweise von Lichtungen im Markfasergehalt der Rinde ist sie deshalb ganz besonders geeignet, da die Gefahr, daß die Färbung nur ungenügend oder die Differenzierung zu intensiv ist, viel geringer erscheint, als bei den anderen Markscheidenfärbungen. Die Bilder von formalin-fixiertem und mit der Schnellbeize nachbehandeltem Material stehen bei diesen Methoden denen nicht nach, die von in Müller'scher Flüssigkeit chromierten Stücken gewonnen wurden.

Die Vorzüge der Kultschitzky'schen Methode liegen vor allem darin, daß ein Kupfern nicht notwendig ist, daß das essigsaure Hämatoxylin die Schnitte weit weniger brüchig macht als das Lithion- oder Eisenhämatoxylin, daß die Gefahr des Überdifferenzierens gleich null ist, daß die Methode besonders auch nach der Schnellbeizung des in Formol fixierten Stückes ausgezeichnete Bilder gibt und endlich, daß die Färbung den Markfasergehalt in größter Vollständigkeit zur Anschauung

bringt. Wegen ihrer Sicherheit und Einfachheit erscheint die Kulschitzky'sche Modifikation der Weigert'schen Markscheidenfärbung allen anderen Markscheidenfärbungen, auch der Originalmethode, überlegen. Sie gibt bisweilen auch in solchen Fällen noch brauchbare Bilder, in welchen die anderen Methoden nur Unvollkommenes leisten. Man sollte daher für die Feststellung von Markfaserlichtungen stets auch diese Methode zu Rate ziehen.

Will man den gelblichen Grund der Präparate entfärben, so verfährt man nach Wolters — in Analogie zu der Pal'schen Methode — folgendermaßen:

1) Färben in essigsaurer Hämatoxylinlösung (12—24 Stunden).
2) Eintauchen der aus der Farbe kommenden Schnitte in Müller'sche Flüssigkeit und
3) Übertragen in eine $^1/_3$-proz. Lösung von übermangansaurem Kali usw. wie bei der Pal'schen Modifikation (s. d.)

Die Bilder sind äußerst elegant, zumal wenn man die häufig auftretenden gelben Flecke in der Weise beseitigt, daß man die Prozedur des Differenzierens mehrfach wiederholt, wie das bei Besprechung der Pal'schen Färbung, welcher das Kulschitzky-Wolter'sche Verfahren übrigens wesentlich überlegen ist, angegeben wurde. Mit Rücksicht auf diese meist notwendig werdende Wiederholung der Differenzierung erscheint es zweckmäßig, die Schnitte in der Kal. hypermang.-Lösung in einem Porzellansiebe aufzufangen und sie darin durch die verschiedenen Flüssigkeiten zu führen.

Mit der Kulschitzky'schen Methode gelingt zuweilen auch eine Markscheidenfärbung am Gefrierschnitt.

1) Chromierung der mit dem Gefriermikrotom erhaltenen nicht zu dünnen Schnitte am besten in $^1/_2$-proz. Chromsäurelösung, welche (mit den Schnitten) etwa 3mal bis zum Aufsteigen von Blasen erwärmt wird.
2) Rasches Abspülen.
3) Färben, Differenzieren usw.

Auch mit anderen Markscheidenmethoden lassen sich an den chromierten Gefrierschnitten zuweilen brauchbare Markscheidenbilder gewinnen, doch sind wohl die Chancen für das Gelingen der Färbung bei Anwendung der Kulschitzky'schen, resp. K.-Wolters'schen Methode die besten. Immerhin sind die am Gefrierschnitt erzielten Markscheidenfärbungen denen am lege artis vorbehandelten und eingebetteten Material nicht gleichwertig; sie sind in der Regel nur für die Darstellung grober Verhältnisse zu brauchen, etwa zur Veranschaulichung ausgedehnter Systemerkrankungen, sklerotischer Herde usw.

## IV. Markscheidenfärbung mit polychromem Methylenblau nach E. Fränkel.

1) Härtung in Formalin und Chromierung in Weigert's Schnellbeize (Kaliumbichromat-Fluorchromlösung) 4—6 Tage lang.
2) Auswaschen in 70-proz. Alkohol, bis der Alkohol (nach mehreren Tagen) klar bleibt.
3) Nachhärten in Alkohol, Celloidineinbettung.
4) Färbung der Schnitte in Grübler'schem polychromem Methylenblau in flachen Uhrschalen für 6—12 Stunden.
5) Abgießen der Farblösung, die nach Filtrieren wieder benutzt werden kann, und Abspülen der Schnitte mit destilliertem Wasser.

6) Übertragen der Schnitte mittels Spatel in eine konzentrierte wässerige Tanninlösung, in der sie etwa 6 Stunden bleiben.
7) Abgießen der Tanninlösung und mehrmaliges Übergießen der Schnitte mit destilliertem Wasser, bis dieses klar bleibt.
8) Wiederholung der Färbung mit polychromem Methylenblau und der Entfärbung in konzentrierter Tanninlösung (gleiche Zeitdauer wie beim ersten Male.)
9) Gründliches Auswaschen in destilliertem Wasser.
10) Alkohol, Bergamottöl.
11) Übertragen der Schnitte aus dem Bergamottöl auf den Objektträger.
12) Übergießen mit Xylol (zur Entfernung des Bergamottöls), Balsam.

Die Methode gibt recht elegante Bilder, in welchen sich die tiefblau gefärbten Markscheiden klar von dem hellen Untergrunde abheben. Zugleich ist die Methode eine gute Bakterienfärbung.

Wichtig für das Gelingen der Färbung: mehrtägiges Auswaschen der in der Schnellbeize chromierten Gewebsstücke in Spiritus, bis er ganz klar bleibt; Verwendung von destilliertem Wasser zum Abspülen der Schnitte.

Die eben aufgeführten Methoden dienen zur Darstellung des Markfasergehaltes überhaupt und damit zum Nachweis von Faserdegenerationen. Im allgemeinen treten jedoch solche im Markscheidenbilde erst in die Erscheinung, wenn der degenerative Prozeß ein gewisses Alter (mindestens 1 Monat) erreicht hat; zur Darstellung frischer Degenerationen sind diese Methoden ungeeignet. Dazu bedient man sich der

### V. Marchi'schen Chrom-Osmium-Methode.

1) Möglichst dünne Scheiben werden mindestens 8 Tage lang in Müller'scher Flüssigkeit fixiert.
2) Übertragung für 8—12 Tage in eine frisch bereitete Mischung von
   Müller'scher Flüssigkeit 2 Teile
   1-proz. Osmiumsäure 1 Teil
   (Glasperlen od. ä. auf den Boden des Gefäßes!).
3) 12—24stündiges Auswaschen in fließendem Wasser.
4) Rasches Nachhärten in Alkohol (innerhalb von höchstens 12 St.) oder besser in Aceton (innerhalb von 2 Stunden).
5) Rasches Einbetten in Celloidin (innerhalb von 6—10 Stunden.)
6) Sofortiges Schneiden der Celloidinblöcke (dicke Schnitte!)
7) Alkohol, Karbolxylol oder Xylol, Balsam.

Diese Methode ist ein außerordentlich feines Reagens auf frischen Ausfall von Markfasern; die degenerativen Vorgänge dürfen im allgemeinen nicht jünger als 10 Tage und nicht älter als etwa 3 Monate sein; das Optimum der Methode liegt bei etwa 3 Wochen alten Prozessen. In der Regel wird es notwendig sein, die Marchi'sche Methode zum Nachweis frischer Degenerationen neben der Weigert'schen Methode zum Nachweis älterer Faserausfälle anzuwenden. Die intensiv schwarz gefärbten Zerfallsprodukte der Markscheiden heben sich als kompakte schwarze Kugeln und Schollen, die sich bei längsgetroffenen Fasern kettenförmig aneinanderreihen, scharf von dem hellgelben Untergrunde ab.

Die Beurteilung der Marchi-Bilder wird nicht selten dadurch erschwert, daß sich auch sonst im Präparat dunkle Pünktchen und Körner oder auch gröbere Niederschläge finden. Sie sind häufig die Folge mangelhafter Technik und entstehen z. B. infolge ungenügender Chromierung, Fäulnis, Druck und Zerrung bei Herausnahme des Nervensystems aus der Leiche (Nervenwurzeln!) usw. Die Vorbehandlung mit Formol und eine zu lange Konservierung in Müller'scher Flüssigkeit hat ebenfalls häufig eine Pseudomarchireaktion zur Folge. Andererseits können tätsächlich vorhandene frische Degenerationen dadurch im Präparate verborgen bleiben, daß man die osmierten Stücke zu lange in Alkohol oder Celloidin läßt; die osmierten, fettähnlichen Substanzen lösen sich darin allmählich auf, und wenn es sich um nur spärliche Degenerationszüge handelt, so können diese wieder aus dem Präparate verschwinden. Die gleiche Gefahr besteht bei zu langem Aufbewahren der fertigen Celloidinblöcke in Spiritus, worin sie bald auch eine diffuse, schmutzige Verfärbung erfahren.

Wichtig für das Gelingen der Methode und die Vermeidung von Fehlerquellen ist demnach: möglichst frisch konservieren, Quetschungen und Zerrungen vermeiden, einlegen direkt in Müller'sche Flüssigkeit (nicht zuvor erst in Formalin), osmieren nicht vor 8tägiger, nicht nach 6wöchiger Chromierung; Einlegen von möglichst dünnen Scheiben in das Chromosmium-Gemisch, da letzteres sehr schwer in die Tiefe des Gewebes dringt, deshalb auch Zusatz von neuem Osmium, wenn der Osmiumgeruch abnimmt, und mehrfaches Umschütteln oder Umlegen der auf Glaswolle zu legenden Scheiben; sorgfältiges Auswaschen, da das überschüssige Osmium später die Präparate trübt; rasches Nachhärten, am besten in Aceton, rasches Einbetten, eventuell Schneiden der uneingebetteten, mit Siegellack aufgeklebten Stücke unter Alkohol. Die auf Längsschnitten kettenförmige Anordnung der Marchischollen gibt in fraglichen Fällen darüber Aufschluß, ob es sich um echte Degenerationsprodukte handelt oder nicht.

Eventuelle Nachfärbung am besten mit dem van Gieson'schen Gemisch, weil hier neben den Körnchenzellen auch die Achsenzylinder und die übrigen zelligen Bestandteile sehr schön hervortreten.

Zur Anlegung von Schnitten durch ganze Hemisphären, welche nach Marchi behandelt werden sollen, eignet sich besonders der von Starlinger oder der neue von Edinger konstruierte Apparat.

## E. Färbung der Neuroglia.

Von allen Methoden, welche die faserige Neuroglia zur Darstellung bringen, ist die praktisch und historisch bedeutungsvollste

### I. Die Färbung der Glia von Weigert.

1) Fixierung und Beizung der ½ cm hohen Scheiben mindestens 8 Tage lang in einer durch Aufkochen hergestellten Lösung von

| | | |
|---|---|---|
| Fluorchrom | 2,5 | Teile |
| Wasser | 100 | „ |

der noch heißen Lösung werden nach Ausdrehen der Flamme zugesetzt

Gewöhnliche Essigsäure 5 Teile,
feingepulvertes neutrales essigsaures
Kupferoxyd (stark umrühren!) 5 „

Nach dem Erkalten werden der Flüssigkeit zugesetzt
Formol 10 Teile

2) Abspülen mit Wasser, Alkohol, Celloidin.
3) Reduktion. Man bringt die Schnitte zunächst für etwa 10 Minuten in eine $^1/_3$-proz. Lösung von Kali hypermanganicum, wäschst sie nach Abgießen dieser Lösung vorsichtig mit Wasser ab, gießt auch dieses Wasser ab und bringt die Schnitte für 2—4 Stunden in die filtrierte Reduktionsflüssigkeit von

Chromogen (Höchster Farbwerke) 5 Proz.
Ameisensäure (spezif. Gew. 1,20) 5 „
Wasser 100 „

Zu je 90 ccm dieser Flüssigkeit werden vor dem jedesmaligen Gebrauch 10 ccm einer 10-proz. Lösung von Natriumsulfit (einfach schwefligsaures Natron) zugesetzt.

In dieser Flüssigkeit werden schon nach 10 Minuten die durch das übermangansaure Kali gebräunten Schnitte entfärbt.

4) Zweimaliges Abspülen in Wasser.
5) Färbung, kurze Zeit auf dem Objektträger, in einer heißgesättigten alkoholischen (70—80-proz. Alkohol) Lösung von Methylviolett, die beim Erkalten vom Bodensatz abgegossen worden ist. Auf je 100 ccm setzt man dieser Lösung je 5 ccm einer wässerigen 5-proz. Oxalsäurelösung zu.
6) Übertragen, ebenfalls auf dem Objektträger, in Jodjodkaliumlösung = gesättigte Lösung von Jod in 5-proz. Jodkaliumlösung.
7) Entfärben in einem Gemisch von Anilinöl und Xylol zu gleichen Raumteilen.
8) Vollständiges, sorgfältiges Entfernen des Anilinöl-Xylols durch Xylol.
9) Kanadabalsam.

Anstatt die Gewebsstücke direkt in die Kupferoxydfluorchrombeize zu legen, kann man sie auch zuvor in 10-proz. Formalin fixieren und darin konservieren. — Die fertigen Präparate bleiben einige Tage in diffusem Tageslichte liegen, da sie sich dann besser halten.

Nach dieser Methode färben sich die Neurogliafasern blau, das Bindegewebe bleibt farblos. Wenn es aber, wie gewöhnlich, auf eine Farblosigkeit des Bindegewebes nicht ankommt, so bringt man besser die Schnitte nach Abgießen der Reduktionsflüssigkeit und nach zweimaligem Aufgießen von Wasser in eine einfache, nicht mit Säure versetzte, 5-proz. wässerige sorgfältig filtrierte Chromogenlösung und läßt die Schnitte hierin über Nacht = Kontrastfärbung.

Das kollagene Gewebe wird zwar auf diese Weise blau, mit einem Stich ins Violette, aber anderseits werden die Neurogliafasern viel dunkler, so daß auch die feinsten hervortreten, und außerdem nehmen, was ebenfalls von Vorteil ist, die Ganglienzellen, die Ependymzellen und die gröberen Achsenzylinder einen gelblichen Ton an.

(Eine im Prinzip ganz ähnliche Färbungsmethode kann man noch für viele andere Gewebselemente anwenden: Gallenkapillaren, cuticulare Substanzen an den Nierenepithelien und sonstigen Epithelzellen, Milzstrukturen, doppelt lichtbrechende Substanz der quergestreiften Muskeln usw.)

Leider haftet dieser ausgezeichneten Methode der Fehler an, daß sie nicht selten versagt, zumal bei septischen, tuberkulösen usw. Leichen. Am ehesten lassen sich Mißerfolge durch strengste Befolgung der von Weigert selbst angegebenen Vorschriften vermeiden (Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia, Frankfurt 1895; Artikel „Neurogliafärbung" in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik). Besonders wichtig: möglichst lebenswarmes Material, dünne Scheiben, alsbaldiges Färben der Schnitte nach der Reduktion bezw. nach der Kontrastfärbung, Ameisensäure und Jodlösung genau nach Vorschrift, sorgfältiges Auswaschen in Xylol, Fließpapier (Flinsch, Frankfurt, Filtrierpapier Nr. 1116). Die Celloidin- (oder Paraffin-) Blöcke müssen möglichst bald geschnitten werden.

Die Modifikationen der Weigert'schen Gliafärbung können die Mängel in der Sicherheit der Methode nicht beseitigen. — Entgegen der Vorschrift Weigert's bevorzuge ich die Paraffineinbettung (rasches Nachhärten in Alkohol oder besser in Azeton [2 Stunden im Brutofen]). Statt der gesättigten alkoholischen Methylviolettlösung verwende ich neuerdings mit gutem Erfolg eine Karbolmethylviolettlösung:

| | |
|---|---|
| Gesättigte wässerige Methylviolettlösung | 100,0 |
| Karbolsäure | 5,0 |
| Alkohol absolut. | 10,0 |

In dieser Lösung werden die aufgeklebten Schnitte $^1/_2$—1 Stunde lang im Brutofen gefärbt. Jedesmal benütze ich zwei Methylviolettlösungen, eine von Methyl 5B an erster und eine von Methyl B an zweiter Stelle; letztere hat eine rötliche Nuance im Violett; dadurch tritt oft auch das Gliaprotoplasma, wenigstens an den großen Spinnenzellen, hervor. Außerdem bleiben viel seltener die sonst so lästigen Jodkristalle zurück.

Die Weigert'sche Gliafärbung bringt nur die menschliche Neuroglia zur Anschauung. Doch läßt sich nach unseren Erfahrungen die pathologisch vermehrte Glia auch bei Tieren nicht selten mit dieser Methode darstellen, wenn man das Karbolwasser-Methylviolett verwendet und wenn man event. den aufgeklebten, entparaffinierten Schnitt noch einmal beizt, am besten mit einer $2^1/_2$-proz. Lösung von schwefelsaurem Eisenammoniumoxyd.

## II. Färbung nach Benda.

A. Härtung.

1) Formalin (10-proz. — rein!) 2 Tage.
2) Mehrtägige Beizung in Weigert's Gliabeize im Brutofen; danach Wässern.
3) Nachbeizung für 2 Tage in 0,5-proz. Chromsäurelösung; danach Wässern (24 Stunden).
4) Entwässern in steigendem Alkohol, Paraffineinbettung.
5) Schneiden und Aufkleben der Schnitte (japanische Methode).

B. Färbung der von Paraffin befreiten Schnitte.
6) Beizen 24 Stunden in 4-proz. Eisenalaunlösung oder verdünntem Liquor. ferri sulfuric. oxyd. (1 : 2).
7) Abspülen in fließendem Wasser.
8) 24 Stunden in dünner, bernsteingelber, wässeriger Lösung von sulfalizarinsaurem Natrium (Marke Kahlbaum).
9) Eintauchen in Wasser, Abtupfen mit Fließpapier.
10) Färbung in 0,1-proz. wässeriger Lösung von Toluidinblau, Erwärmen bis Dämpfe aufsteigen, dann etwa 15 Minuten in der erkaltenden Lösung.
11) Eintauchen in 1-proz. Essigsäure.
12) Abtrocknen mit Fließpapier, Eintauchen in Alkohol absolutus.

Da die Gliafärbungen von Mallory, Jamagiwa, Anglade u. A. keine Vorteile gegenüber der Weigert'schen Methode bieten, sondern an Elektivität und Prägnanz der Bilder hinter ihr zurückstehen, kann hier auf ihre Beschreibung verzichtet werden. Erwähnt sei nur, daß die Modifikation der Weigert'schen Fibrinfärbung von Beneke (s. S. 75) bisweilen brauchbare Bilder gibt.

In allen Fällen, wo es nicht auf eine vollständige elektive Färbung der Glia ankommt und wo es sich um gröbere Wucherungen des Stützgewebes handelt, leistet die Weigert'sche Eisenhämatoxylin — van Gieson-Färbung und besonders die Mallory'sche Achsenzylinderfärbung (s. S. 67) recht gutes. Letztere ist namentlich sehr dazu geeignet, den typischen Bau in Gliomen hervortreten zu lassen.

Eine Färbemethode, die den protoplasmatischen Anteil des ektodermalen Stützgewebes in leidlich vollständiger Weise zur Darstellung brächte, besitzen wir zur Zeit noch nicht. Als die für pathologisch-anatomische Zwecke wichtigsten seien hier nur erwähnt:

I. Die Nissl'sche Alkohol-Seifenmethylenblau- (resp. Toluidinblau-) Methode.

S. die Beschreibung auf S. 192. Eine strikte Befolgung der von Nissl angegebenen Verschriften ist unerläßlich.

II. Die Färbung mit Nigrosin oder Anilin-Blue-black.

1) Härten in Müller'scher Flüssigkeit, bis die Stücke schnittfähig sind.
2) Trocknen der Unterfläche des Stückes mit dem erhitzten Spatel, Aufkleben auf ein Holzklötzchen mittels Siegellack.
3) Schneiden unter Seifenwasser.
4) Färbung in konzentrierter wässeriger Lösung von Nigrosin oder Anilin-Blue-black (englisches Präparat).
5) Auswaschen, Differenzieren und Entwässern in Alkohol.
6) Originumöl, Balsam.

Die protoplasmatischen und retikulären Anteile der Neuroglia, soweit sich letztere überhaupt färben, erscheinen blaugrau, die Achsenzylinder dunkelblau.

## Periphere Nerven und Ganglien

werden im allgemeinen gleich behandelt wie das zentrale Nervensystem. Zupfpräparate leisten hier bisweilen gute Dienste. Am

wichtigsten sind natürlich auch hier die Elektivfärbungen, also die Nissl'sche Methode, bei der wieder besonders darauf zu achten ist, daß das Material uneingebettet geschnitten wird (event. vorheriges Aufschneiden der Bindegewebskapsel der Ganglien), ferner die Weigert'sche Markscheidenfärbung oder ihre Modifikation nach Kultschitzky, die Cajal'schen Methoden zur Darstellung der markhaltigen und marklosen Achsenzylinder und der Endgeflechte. Besonders geeignet für die Darstellung der Achsenzylinder im peripheren Nerv ist die jüngst von Bielschowsky angegebene

### Modifikation seiner Silberimprägnationsmethode.

1) Fixierung in 10—15-proz. Formalinlösung; Gefrierschnitte.
2) Übertragung der Schnitte in 2-proz. Höllensteinlösung und von da in die ammoniakalische Silberlösung wie bei der gewöhnlichen Fibrillenmethode (s. o.).
3) Aus der ammoniakalischen Silberlösung kommen die braunen Schnitte in eine schwache wässerige Essigsäurelösung (5 Tropfen Eisessig auf 20 ccm Wasser), bis sie eine gelbliche Farbe angenommen haben (innerhalb weniger Minuten).
4) Reduktion in 20-proz. Formalinlösung, in welcher die Schnitte bleiben, solange noch weißliche Wolken abgehen.
5) Vergoldung in neutralem Goldbade (s. o.), bis der Grundton rötlich violett geworden ist.
6) Entfernung des ungenügend reduzierten Silbers in einer 5-proz. Lösung von Natriumthiosulfat.

Durch diese Modifikation des Silberimprägnationsverfahrens, in welches also eine Passage der Schnitte durch verdünnte Essigsäure eingeschaltet wird, erreicht man eine Differenzierung der Achsenzylinder vom fibrillären Bindegewebe und von den elastischen Fasern. Die Achsenzylinder erscheinen schwarz, die Bindesubstanzen usw. matt violett; oft färbt sich die Markscheide in leicht rötlichem Tone mit, so daß sich feststellen läßt, wo die Faser marklos wird.

Für die Darstellung degenerativer Vorgänge am peripheren Nerven hat die Marchi'sche Chromosmium-Methode die gleiche Bedeutung wie für das Zentralnervensystem.

### Färbung der Primitivfibrillen im markhaltigen Nerven nach Bethe und Mönckeberg.

1) Fixieren des aufgespannten Nerven in 0,25-proz. Überosmiumsäure (24 Stunden).
2) Auswaschen (6 Stunden).
3) Übertragen in 90-proz. Alkohol (10 und mehr Stunden).
4) Auswaschen (4 Stunden).
5) Übertragen in 2-proz. Lösung von Natriumbisulfit, der auf je 10 ccm 2—4 Tropfen konzentrierte Salzlösung zugesetzt werden.
6) Wasser, Alkohol, Xylol, Paraffin.
7) Aufkleben der 2—3 $\mu$ dicken Schnitte mit Eiweiß und Wasser.
8) Xylol, Alkohol, destill. Wasser.

9) Färbung:
   a) Direkte Färbung in 0,1-proz. Toluidinblaulösung, auf 50—60° erwärmt, 10 Minuten. Abspülen und Wässern 1—2 Minuten. Übertragen für wenige Minuten in 1-proz. Ammoniummolybdatlösung. Abspülen, Alkohol, Xylol, neutraler Kanadabalsam;
   b) indirekte Färbung: Übertragung der Schnitte in eine auf ca. 30° erwärmte Ammoniummolybdatlösung (1-proz.) für 5—10 Minuten, mehrmaliges Abspülen mit der Spritzflasche, Abtrocknen des Objektträgers, Überschichten mit Toluidinblaulösung, Färbung 5 Minuten im Paraffinofen, Abspülen usw.

Zwischen den aufgeschnittenen osmierten Markscheiden sind die Achsenzylinderfibrillen distinkt blau gefärbt; die Methode bringt auch event. Zerfallserscheinungen an den Fibrillen zur Darstellung.

Ausgezeichnete, wenn auch nicht immer sichere Resultate liefert gerade am peripheren Nervensystem die zuerst von Ehrlich benutzte und später von den verschiedensten Untersuchern modifizierte

## Methode der Methylenblauinjektion.

Man injiziert vorsichtig eine vorher filtrierte $^1/_4$—$^1/_6$-proz. Lösung von Methylenblau (am besten „rektifiziertes Methylenblau zur vitalen Injektion“ von Dr. Grübler, Leipzig) in physiologischer Kochsalzlösung. Man kann die Injektion intravenös, subkutan oder in eine Körperhöhle machen. Für manche Fälle kann man auch Methylenblau in Substanz einführen oder frische Organstücke in die Lösung einlegen, indem man die noch lebenswarmen Stücke von Organen, die dem Tier entnommen, in eine dünne Methylenblaulösung ($^1/_{10}$—$^1/_5$ Proz.) einlegt. Am meisten empfiehlt Lawdowsky als Lösungsmittel filtriertes Hühnereiweiß, dem eine gleiche Menge von 0,25-proz. Chlorammoniumlösung beigemengt wird.

In membranösen Objekten kann man die Nerven auch durch Ausbreiten der Membran auf dem Objektträger und Auftropfen einer $^1/_{15}$—$^1/_{20}$-proz. Methylenblaulösung in physiologischer Kochsalzlösung färben. Man beobachtet die Tinktion der Nerven, die nach 20—30 Minuten beginnt, unter dem Mikroskop.

An der lebenden Froschzunge, die man herausschlägt und an einem Korkringe auf einer Glasplatte befestigt, kann man nach Arnold die feinsten Endausbreitungen durch Aufstäuben von Methylenblau in Substanz färben.

Das mit Methylenblau behandelte Organ wird dem Einflusse der Luft ausgesetzt, bis das Leukoprodukt durch Oxydation wieder gebläut ist, worüber man sich durch frische Zupfpräparate Gewißheit verschaffen kann.

Ist die Nervenfärbung eingetreten, so nimmt man die Fixierung am besten nach einer der von Bethe angegebenen Methoden vor.

Die Präparate kommen zur Vorfixierung für 10—15 Min. in eine gesättigte wässerige Lösung von pikrinsaurem Ammonium und dann in eine der folgenden Lösungen:

| | | |
|---|---|---|
| I. | Molybdänsaures Ammonium | 1,0 |
| | Aqua dest. | 20,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |
| II. | Molybdänsaures Ammonium | 1,0 |
| | Aqua dest. | 10,0 |
| | 2-proz. Chromsäurelösung | 10,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |
| III. | Molybdänsaures Ammonium | 1,0 |
| | Aqua dest. | 10,0 |
| | $^1/_2$-proz. Osmiumsäurelösung | 10,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |
| IV. | Phosphormolybdänsaures Natron | 1,0 |
| | Aqua dest. | 10,0 |
| | 2-proz. Chromsäurelösung | 10,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |
| V. | Phosphormolybdänsaures Natron | 1,0 |
| | Aqua dest. | 20,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |
| VI. | Phosphormolybdänsaures Natron | 1,0 |
| | Aqua dest. | 10,0 |
| | $^1/^1$-proz. Osmiumsäurelösung | 10,0 |
| | Acid. hydrochloric. offic. | 1 Tropfen. |

Die Gemische I, II, IV und V wendet Bethe für dicke Objekte, welche in toto untersucht werden sollen, an. Mischung III und VI eignen sich für dünne Präparate, oder solche, die später in Schnitte zerlegt werden sollen; in letzteren Gemischen fixiert man 4—12 Stunden, dann Auswaschen, Entwässern, Paraffineinbettung.

Das Ammoniummolybdat und das phosphormolybdänsaure Natron werden unter Erhitzen in Wasser gelöst, bis die Trübung verschwindet. Der beim Zusatz von Salzsäure entstehende Niederschlag löst sich beim Schütteln wieder. Ist Methylenblau injiziert worden, so kommt das Objekt direkt in die Fixierungsflüssigkeit; ist dieses in Methylenblau eingelegt worden, so wird es vorher in 0,6 NaCl-Lösung abgespült. (Genauere Angaben über die Methodik enthält: Bethe, Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems, Leipzig 1903. Dogiel: Artikel „Methylenblau zur Nervenfärbung“ in der Enzyklop. d. mikrosk. Technik).

Diese vitale Methylenblaufärbung ergibt sehr schöne Bilder von den nervösen Strukturen, speziell von den feinen peripheren Ausbreitungen nervöser Fasern. Wie bei der Golgi-Methode erfolgt die Färbung mit Auswahl. Die Glia bleibt ungefärbt.

## Nachtrag zu S. 158.

**Naphtholblaureaktion:** Durch oxydative Vorgänge wird aus α-Naphthol und Dimethyl-Paraphenylendiamin Indophenolblau gebildet. Diese Synthese findet bei Anwesenheit von oxydativen Fermenten fast momentan statt. Im Körper liefern die reifen und unreifen Leukocyten der Knochenmarksreihe diese Reaktion, auch in Gefrierschnitten nach vorausgegangener Formalinfixierung. Nach W. H. Schultze verfährt man folgendermaßen:

1) Gefrierschnitte für 2—3 Minuten in 1-proz. wässerige Lösung von α-Naphthol (der man beim Kochen soviel konzentrierte Kalilauge (ca. 1 ccm zu 100 ccm) zugesetzt hat, bis alles gelöst ist).
2) Übertragen für 2—3 Minuten in 1-proz. wässerige Lösung von Dimethylparaphenylendiamin (Merck). Die Lösung ist nur einige Tage haltbar.
3) Abspülen in Wasser, Untersuchen in Wasser, Kali aceticum, Glyzerin oder Glyzeringelatine. Alle Leukocytenkörnelungen intensiv blau. Sofortige Betrachtung ist wünschenswert, da nach einiger Zeit Diffusion des Farbstoffs in die Fettsubstanzen auftritt und diese violett bis bläulich färbt. Die Reaktion ist nicht haltbar. Ich bevorzuge, besonders bei unfixierten Präparaten, wegen der geringeren Quellung heiß gesättigte und mehrfach kalt filtrierte Lösung von Naphthol in destilliertem Wasser ohne Alkalizusatz.

# Register.


**A.**

*Abbe*'scher Beleuchtungsapparat 1.
*Abnutzungspigmente* 93.
*Abstrichpräparate*, frische 8.
*Achsenzylinderfärbung* 196. 208.
*Agar* nach Deetjen 144.
*Agareinbettung* 34.
*Aktinomycespilz* 127.
*Alaunhämatoxylin* 50. 51.
*Alaunkarmin* 53.
*Alizarin*, Kalkfärbung 89.
*Alkohol* als Isolationsflüssigkeit 10.
*Alkoholhärtung* 14.
„ zur Darstellung der Mitosen 64.
*Altmann's* Fixierung 64.
„ Darstellung der Zelleinschlüsse 65.
*Ammoniak*, harnsaures 170.
*Ammoniakmagnesia*, phosphorsaure 170.
*Amoeba coli* 138.
*Amyloid* 77.
*Amyloidleber* zum Einbetten von Objekten 8.
*Amyloidreaktionen* 78.
*Amylum*, Nachweis 78.
*Anilinblaumethode* von Mallory 68.
*Anilin-Blue-Black* 207.
*Anilinfarben* 56. 100.
*Anilinöl* zur Einbettung 32.
*Anilinöl* zum Entfärben 74. 102. 111.
*Anilinölxylol* zum Aufhellen 49.
*Anilinwasser* 101.
*Anilinwasserfuchsin* 101.
*Anilinwassergentianaviolett* 101.
*Anilinwassersafranin* nach Babes 63.
*Anthrakose* 93.
*Apathy*, Hämatoxylinfärbung 52.
*Apochromat* 2.
*Argentum nitricum* zur Kalkfärbung 89.
*Arnold*, Blutuntersuchung 143.
„ Färbung der Zellgranulationen 66.
„ Fibrinbildung, Untersuchung 159.
Isolationsflüssigkeiten 10.
*Arnold* Untersuchungsflüssigkeit 96.
„ vitale und supravitale Granulafärbung 13.
*Asphaltlack* 47.
*Assmann*, Blutfärbung 154. 157.
*Asthmakristalle* 173.
*Atrophie* 95.
*Auburtin*, Methode der Serienschnitte 42.
*Aufhellungsmittel* 48.
*Aufkleben* von Stücken auf Holz 30.
„ „ „ „ Stabilit 30.
*Auge* 178.
*Auspinselung* von Schnittpräparaten 44.
*Ausschütteln* von Schnittpräparaten 44.
*Azeton* zur Schnelleinbettung 15. 30. 32.
*Azetonalkohol* als Entfärbungsmittel 103.
*Azetonxylol* „ „ 74. 111.
*Azur* 153.
*Azurgranula* 151.

**B.**

*Babes*, Anilinwassersafranin 63.
*Bacillus* des Abdominaltyphus 120.
„ der Cholera 130.
„ „ Diphtherie 121.
„ „ Influenza 119.
„ „ Lepra 127.
„ des malignen Ödems 117.
„ der Mäuseseptikämie 118.
„ des Milzbrandes 117.
„ der Pest 119.
„ des Rauschbrandes 117.
„ „ Rhinoskleroms 116.
„ „ Rotzes 118.
„ „ Schweinerotlaufs 118.
„ „ Smegma 126.
„ „ Tetanus 117.
„ der Tuberkulose 122.
„ des Typhus 120.
„ „ Ulcus molle 120.
*Bacterium coli commune* 121.
*Bakterien*, Deckglastrockenpräprarate 99.
„ epiphytische 135.
„ Färbung 99.
„ „ isolierte 100.

*Bakterien*, Geißeln 104.
„ Schnittpräparate 109.
„ „ v. Gelatinekulturen 113.
„ Sporenfärbung 106.
„ Struktur 104.
„ Untersuchung auf dem Objektträger 98.
„ Untersuchung im hängenden Tropfen 98.
*Bandwürmer* 137.
*Baumgarten*, Darstellung der Mitosen 65.
„ Färbung der Leprabazillen 127.
*Beale's* Karmin 55.
*Beizen* 46.
*Benda*, Hämatoxylinfärbung 52. 53.
„ Reaktion auf Fettgewebsnekrose 84.
„ Neurogliafärbung 205.
*Beneke*, Fibrinfärbung, Modifikation 75.
*Berliner Blau*, Reaktion 90.
„ „ zur Injektion 26.
*Best*, Glykogenfärbung 86.
*Bethe*, Methylenblaumethode 209.
„ Fibrillenfärbung 208.
*Biedert*, Sedimentierungsverfahren 123.
*Bielschowsky*, Achsenzylinderfärbung 195. 207.
*Bignami*, Malariaplasmodien 140.
*Bilirubin* 93.
*Bindegewebsfasern* 67.
*Biondi*, Blutuntersuchung 155.
„ *-Heidenhain's* Färbung 57.
*Birch-Hirschfeld*, Färbung von Amyloidpräparaten 80.
*Bismarckbraun* 56.
*Bizzozero-Vassale*, Färbung der Mitosen 64.
*Blenden* 3.
*Blut*, Bakterien in demselben 159.
„ Bestandteile, fremde in dems. 159.
„ Deckglastrockenpräparate 145.
„ Fixierung 146.
„ Färbung nach Ehrlich 147.
„ „ „ Assmann 154. 157.
„ „ „ Giemsa 131.
„ „ „ Leishman 154.
„ „ „ May-Grünwald 154.
„ „ „ Romanowsky-Ziemann 151.
„ „ „ Schridde 156.
„ „ „ Sternberg 156.
„ „ „ Zieler 156.
„ Granulafärbung, vitale 143.
„ Granulationen 147.
„ in Schnitten nach Biondi 155.
„ Konservierungsflüssigkeiten 144.
„ Untersuchung, frische 143.
„ „ auf Hollundermarkscheibchen 143.
„ Zusatzflüssigkeiten 144.
*Blutfarbstoff* 181.
*Blutflecken*, Untersuchung 181.
*Blutkörperchen*, kernhaltige rote 144.
*Blutkörperchenzählung* 160.
*Blutpigment* 90.
*Blutplättchen* 144. 158.
*Blutspuren* 181.
*Blutuntersuchung* 142.
*Boeck*, Nachweis von Bakterien der Haut 136.
*Boehm*, Darstellung der Gallenkapillaren 167.
„ Darstellung des Faserwerks der Leber 168.
*Boraxkarmin* 55.
„ zur Färbung der Nervensubstanz 190.
*Bostroem*, Aktinomycesfärbung 129.
*Bremers* Reaktion an Diabetesblut 155.
*Bunge*, Geißelfärbung 105.

**C** (s auch K u. Z).

*Celloidineinbettung* 29.
*Celloidinparaffineinbettung* 33.
*Celloidinpräparate*, Entwässerung 48.
„ Serienschnitte 40.
*Cellulose*, Nachweis 78.
*Chenzinsky*, Farblösung 151.
*Chitin*, Nachweis 137.
*Chlorpalladiumlösung* zur Entkalkung 23.
*Cholesterin* 85.
*Cholerabazillen* 130.
„ Nachweis im Darminhalt 166.
*Chorioidea*, Pigmentuntersuchung 179.
*Chromaffines* Gewebe 170.
*Chromameisensäure* zur Darstellung von Mitosen 64
*Chromhämatoxylin* 52.
*Chrompikrinsäure* 64.
*Chromogen* 205.
*Chromsäure* zur Entkalkung 23.
„ „ Isolation 10.
„ „ Darstellung der Mitosen 64.
*Claudius*, Gram'sche Färbung, Modifikation 103. 110.
*Coccidien* 141.
*Colloid* 77.
*Cohnheim*, Goldmethode 179.
„ Injektionsflüssigkeit 26.
*Cornea* 179.
„ vitale Färbung beim Frosch 13.
*Corpora* amylacea 78.
*Curettement* 173.
*Curschman'sche* Spiralen 173.
*Cysticercus* cellulosae 137.
*Cystin* 170.
*Czaplewski*, Tuberkelbazillenfärbung 125.

**D.**

*Darkschewitsch*, Methode für Serienschnitte 42.
*Darm* 165.

*Darm*, Konkremente 166.
*Darminhalt* 166.
„ Blutnachweis 166.
„ Cholerabakterien 166.
*Deciduareste* 173. 186.
*Deckglas* 6.
*Deckglaskitt* 47.
*Deckglastrockenmethode* 99. 145.
*Deetjen-Agar* 144.
*Degeneration*, amyloide 77.
„ fettige 80. 95.
„ hyaline 77.
„ kolloide 77.
„ schleimige 76.
*Degenerative* Veränderungen, Untersuchung 95.
*Dimmer*, Methode der Serienschnitte 41.
*Diphtheriebacillus* 121.
„ Darstellung der Polkörner 121.
*Diplococcus* intracellularis meningitidis 116.
„ pneumoniae 114.
*Doppelbrechung* 5. 84.
*Doppelfärbung* 58.
*Doppelmesser* 8.
*Drittelalkohol* 10.
*Drüsen*, Färbung 58.
*Dunkelfeldbeleuchtung* 5. 98.
*Durchfärbung* 61.

## E.

*Ebner's* Entkalkungsflüssigkeit 23.
*Echinococcus* 137.
*Ehrlich*, Blutuntersuchung 145 ff.
„ Deckglastrockenpräparate von Blut 146.
„ Gentianaviolettlösung 64.
„ Hämatoxylineosinlösung 60.
„ Hämatoxylinlösung, saure 52.
„ Mastzellen, Darstellung 149.
„ Tuberkelbazillenfärbung 124.
*Einbettungsmethoden* 28.
*Einstichverfahren* zur Injektion 28.
*Eisen*, Nachweis 90. 94.
*Eisenhämatoxylinfärbung* 52.
*Eiterkokken* 114.
*Eiweisslösung* zum Aufkleben von Paraffinschnitten 39.
*Elastische* Fasern, Darstellung 69.
„ „ im Sputum 173.
*Eleïdin* 73.
*Endokarditis* 162.
*Entartung*, amyloide 77.
„ fettige 80.
„ hyaline 77.
„ kolloide 77.
„ schleimige 76.
*Entkalkung* 20.
*Entpigmentierung* 94.
*Entwässerung* von Celloidinschnitten 48.
*Entzündungsversuch* 97.
*Eosin* 59.
*Eosinophile* Zellen 148.
„ „ im Sputum 173.
*Epithelfasern* 164.
*Epithelkörperchen* 171.
*Erlicki*'sche Flüssigkeit 17.
*Ermengem, van*, Geißelfärbung 105.
*Erysipelkokken* 114.
*Essigsäure* zur Untersuchung frischer Präparate 11.

## F.

*Fadenpilze* 134.
*Färbetechnik*, Allgemeines 45.
*Färbung* der Bakterien 100.
„ „ Kerne 49.
„ diffuse 58.
„ doppelte 58.
„ frischer Präparate 12.
„ ganzer Stücke 61.
„ vitale 12. 99.
*Fasern*, elastische, Darstellung 69.
„ „ im Sputum 173.
„ kollagene 67.
„ Sharpey'sche 175.
*Ferrocyankaliumreaktion* auf Eisen 90.
*Fettreaktionen* 81.
*Fettgewebsnekrose* 84. 95.
*Fettsäuren* 84.
*Fibrin* 74. 159.
*Fischer*, Elastin-Fettfärbung 72.
*Fixierung* 14.
*Flemming's* Säuregemisch 19.
*Florence*'sche Reaktion 185.
*Fluorescin*, Entfärbung durch 102. 125.
*Flüssigkeiten*, Untersuchung 7.
*Foà*, Härtungsflüssigkeit für Blut in Geweben 156.
*Fol's* Entkalkungsflüssigkeit 24.
„ Fixierungsflüssigkeit 64.
*Formalin* als Härtungsmittel 15.
„ „ Isolationsflüssigkeit 10.
„ „ Zusatzflüssigkeit 12.
„ Härtung des Zentralnervensystems 188.
„ Mischung mit Müller'scher Flüssigkeit nach Orth 17.
„ nach Kaiserling 20.
„ nach Melnikow-Raswedenkow 20.
„ -Salpetersäure z. Entkalkung 21.
*Fränkel, C.*, Schimmelpilzuntersuchung 135.
*Fränkel, E.*, Vierfachfärbung 70.
„ Markscheidenfärbung 202.
*Friedländer's* Kapselfärbung 108. 109.
„ Bacillus 116.
*Fuchsinessigsäure* 11.
*Fuchsinfärbung* der Bakterien nach Pfeiffer 112.

## G.

*Gabbet*, Tuberkelbazillenfärbung 124.
*Galeotti*, Zymogenkörnchen 168.

*Gallenfarbstoff* 92.
*Gallenkapillaren*, Darstellung 167.
*Gallerthüllen* der Bakterien 108.
*Ganglienzellen*, Färbung 191.
*Gefässe*, Untersuchung 161.
*Gefriermikrotom* 9. 34.
*Gehörorgan* 180.
*Geisseln* der Bakterien 104.
*Gelatinekulturen* Schnittpräparate davon 113.
*Gentianaviolett*, Amyloidreaktion 79.
„ Bakterienfärbung 103.
„ Kernfärbung 57.
*Gentianaviolettlösung* von Ehrlich 64.
*Geschlechtsorgane*, Untersuchung 173.
*Geschwülste* 96.
*Gewebe*, kollagenes 67.
*Giemsafärbung* 131.
*Gieson, van*, Färbungsmethode 60.
„ „ für Nervensystem 207.
*Glasgegenstände* 6.
*Gliafasern*, Darstellung 203.
*Glykogen*, Nachweis 85.
*Glyzerin* zur Untersuchung frischer Präparate 10.
„ zur Einlegung von Schnitten 47.
*Glyzerinätherlösung* 157.
*Glyzerineiweisslösung* zum Aufkleben von Paraffinpräparaten 39.
*Glyzeringelatine* 37. 47.
*Gmelin*'sche Reaktion 92.
*Goldfärbung* von Cohnheim 179.
*Golgi*, Silbermethode für Ganglienzellen 195.
*Gonokokken* 99. 115.
*Gram*'sche Färbung für Trockenpräparate 102.
„ „ „ Mitosen 63.
Schnitte 110.
*Granulation* der weißen Blutzellen 147 ff.
„ vitale 12.
*Gummikollodiumplatten* für Serienschnitte 43.

## H.

*Haare*, Untersuchung 183.
*Hämalaun* 51.
*Hämatein* 49.
*Hämatin*, salzsaures 182.
*Hämatoidin* 89.
*Hämatoxylineosinfärbung* von Amyloid 80.
*Hämatoxylineosinlösung* von Ehrlich 60.
*Hämatoxylinfärbung* 49.
„ Doppelfärbung mit Eosin 60.
„ Doppelfärbung mit Karmin 59.
„ Doppelfärbung mit Pikrinsäure 60.
„ nach Apathy 52.
„ „ Benda 52. 53.
*Hämatoxylinfärbung* nach Ehrlich 52.
„ „ Heidenhain 52.
„ „ Kalkfärbung 88.
„ „ Kulschitzky f. d. Zentralnervensyst. 201.
„ „ Weigert für das Zentralvervensyst. 198. 200.
*Häminkristalle* 182.
*Hämoglobin*, Fixierung 146.
*Hämosiderine*, Nachweis 90.
*Härtungsmethoden* 14.
*Hall*, Eisennachweis 91.
*Harn* 169.
„ Tuberkel- und Smegmabazillen 169.
*Harnapparat* 169.
*Harnsäure* 170.
„ Konservierung 20.
*Harnzylinder* 170.
*Harris*, Amyloidnachweis 79.
*Häute*, seröse 163.
*Haut* 164.
„ Bakterien 135.
*Hayem*, Flüssigkeit 145.
*Hefe*, Untersuchung 134.
*Heidenhain*, Eisenhämatoxylinfärbg. 52.
„ Eisenhämatoxylinfärbung z. Darstellung d. Verhornung 72.
„ Neutralfärbungen 162.
„ Chrom-Hämatoxylinfärbung 52.
„ -*Biondi*, Färbung 57.
„ Protoplasmastrukturen 67.
*Held*, Nervenzellfärbung 195.
*Henke-Zeller* Schnelleinbettung 32.
*Hermann*, Fixierungsflüssigkeit 140.
*Herxheimer*, Fettfärbung 83.
*Herz*, Untersuchung 161.
*Hinterberger* Geißelfärbung 106.
*Hoden* 173.
*Hohlspiegel* 4.
*Hollundermarkplättchen* zur frischen Untersuchung 13. 143.
*Holzessig*, Entkalkung 24.
*Honegger*, Karmin, neutrales 59.
*Honsell*, Smegmabazillen 127.
*Hornfärbung* 72.
*Hoyer*, Muzinfärbung 76.
*Hyalin* 77.
*Hypophyse* 171.

## I.

*Japanische* Methode zum Aufkleben von Paraffinschnitten 39.
*Ikterus* 93.
*Immersionslinsen* 1. 2.

*Imprägnation* mit Kalksalzen 88.
*Indophenolblau*, Fettfärbung 83.
„ Synthese 211.
*Influenzabazillen* 119.
*Injektion* der Lymphgefäße 28.
„ physiologische 28.
*Injektionsverfahren* 25.
*Jodgrünreaktion* auf Amyloid 79.
*Jodtösung* 11.
„ zur Isolation 10.
*Jodreaktion* auf Amyloid 78.
„ „ Corpora amylacea 78.
„ „ Glykogen 86.
„ „ Stärkekörner 78.
*Jodschwefelsäurereaktion* auf Amyloid 78.
„ „ Cellulose 78.
*Irisblende* 3.
*Isolationsflüssigkeiten* 9.

## K.

*Kaiserling*, Sammlungspräparate in natürlichen Farben 20.
*Kali* aceticum zur Untersuchung frischer Präparate 11.
„ „ zur Aufbewahrung von Schnitten 48.
*Kalilauge* 10. 11.
„ Verstärkung der Färbekraft durch Zusatz von 101.
*Kalk*, fettsaurer 84.
„ kohlensaurer 88.
„ oxalsaurer 170.
„ phosphorsaurer 88.
*Kalksalze*, Imprägnation 88.
*Kanadabalsam* 48.
*Kapillarattraktion* beim Aufkleben von Paraffinpräparaten 39.
*Kaplan*, Achsenzylinderfärbung 197.
*Kapselbacillus* von Friedländer 116.
*Karbolfuchsin* 101. 107. 112.
*Karbolwasser* 101.
*Karbolxylol* 41. 49.
*Karmin* von Beale 55.
„ Best's zur Glykogenfärbung 86.
„ alkoholisches 56.
„ neutrales 58.
„ zur Färbung des Nervengewebes 191.
*Keratohyalin* 73.
*Kernfärbungen* 49.
*Kernteilungsfiguren* 62.
*Klein*, Sporenfärbung 107.
*Knochenmark*, Untersuchung 162.
*Knochensystem*, Färbung nach Pommer 174.
„ Färbung nach Scheffer 175.
„ Färbung nach Schmorl 177.
„ Kanälchen, Darstellung 176.
*Knochensystem*, Schliffe 176.
„ Untersuchung 174.
*Knorpel*, Färbung 174.
*Kochmethode* zur Härtung 19.
*Kochsalzlösung* 9.
*Kockel*, Fibrinfärbung 75.
*Kohn*, Chromaffines Gewebe 170.
*Kollagenes* Gewebe 67.
*Kollmann's* Injektionsmasse 26.
*Kollodiumplatten* für Serienschnitte 41. 43.
*Kolloid* 77.
*Kossa, v.*, Kalkfärbung 89.
*Kresylviolett* 57.
*Kresofuchsin* 174.
*Kristalllinse*, Isolation 179.
*Kromayer*, Epithelfaserfärbung 164.
*Kühne's* Methylenblaufärbung 112.
*Kultschitzky*, Färbung der Nervenfasern 201.
*Kupfer*'sche Sternzellen 168.
*Kupferbeize*, Fettgewebsnekrose 84.
*Kupferhämatoxylin* 53.

## L.

*Laevulose* 48. 83.
*Lampe* zum Mikroskopieren 4.
*Langhans*, Nachweis von Glykogen 86.
*Laurent*, Methylenblaueosinlösung 154.
*Leber* 166.
*Leiminjektionsmassen* 27.
*Leishman*, Blutfärbung 154.
*Leprabacillus* 127.
*Leucin* 170.
*Leukocyten*, Isolierung nach Plato 143.
*Levaditi*, Spirochaetenversilberung 133.
*Lichtquelle* 3.
*Lipochrome* 93.
*Lipocyankristalle* 93.
*Lithionkarmin* 55.
*Löffler's* Färbung von Bakterienschnittpräparaten 111.
„ Färbung der Geißeln und Wimperhaare der Bakterien 104.
„ Methylenblau 101.
„ Modifikation der Gram'schen Färbung 103. 111.
*Lubarsch*, Schnelleinbettung 32.
*Lugol*'sche Lösung 11.
*Lunge* 171.
*Lupe* 5.
*Lutein* 93.
*Lymphdrüsen* 162.
*Lymphgefässe*, Injektion 28.

## M.

*Magen*, Härtung 165.
„ Differenzierung der Haupt- und Deckzellen 165.
*Malariaplasmodien* 139.
*Mallory*, Färbung der Achsenzylinder 190.

*Mallory*, Färbung der Bindegewebsfasern 67. 68.
„ Färbung der Glia 190.
„ „ von Protozoen 138.
*Marchi*, Untersuchungsmethode des Zentralnervensystems 203.
*Maresch*, Kollagenes Gewebe 69.
*Markscheidenfärbung* 197 ff.
*Maskenlack* 47.
*Mastzellenkörnung* 148. 157.
*Mäuseseptikämie*, Bacillus 118.
*May-Grünwald*, Blutfärbung 154.
*Mazerationsflüssigkeiten* 9.
*Melanine* 93.
*Melnikow-Raswedenkow*, Formalinhärtung mit Erhaltung der Farbe 20.
*Meningokokken* 116.
*Messer* für Mikrotome 37.
*Metallfärbungen* des Kalks 89.
*Metallinstrumente* 7.
*Methylenblau*, polychromes 80. 113. 202.
„ zur vitalen Färbung 13.
*Methylenblaufärbung* von Kühne 112.
„ „ Löffler 101. 111.
*Methylenblauinjektion* zur Darstellung der peripheren Nerven 209.
*Methylgrünreaktion* auf Amyloid 79.
*Methylviolettreaktion* auf Amyloid 79.
*Mikroskope* 1. 2.
*Mikroskopierlampen* 4.
*Mikrospektroskop* 6.
*Mikrotome* 34.
*Milch* zur Injektion 28.
*Milchsäure*, Entkalkung 24.
*Milz*, Untersuchung 162.
*Milzbrandbazillen* 117.
*Möller*, Sporenfärbung 107.
*Mönckeberg*, Fibrillenfärbung 208.
*Muchämatin* 76.
*Müller*'sche Flüssigkeit 16.
„ „ zur Entkalkung 174.
„ „ als Isolationsflüssigkeit 10.
*Muskel*, Untersuchung 178.
*Muskeltrichine* 137.
*Muzikarmin* 76.
*Muzin*, Färbung 76.
*Myelin* 84.

## N.

*Nadel*, stumpfe, für Präparate 7.
*Naphtholblausynthese* 158. 211.
*Natron*, harnsaures 170.
„ saures, harnsaures 170.
*Natronlauge* 11.
*Nebennieren* 170.
*Neisser*, Schnittpräparate von Gelatinekulturen 113.
„ Diphteriebazillenfärbung 121.
*Nekrose* 94.
*Nelkenöl* 48.
„ -Kollodium zum Aufkleben von Paraffinschnitten 39.
*Nervensystem*, zentrales 190.
„ peripheres 207.
*Netzhaut* 179.
*Neurofibrillen* 196.
*Neuroglia* 204.
*Neutralrot* zur Blutuntersuchung 143.
„ zur vitalen Färbung 13.
„ zur Myelinfärbung 84.
*Nicolle*, Thioninlösung 101. 112.
*Niere* 169.
*Nigrosinfärbung* 206.
*Nikiforoff*, Färbung drüsiger Organe 58.
„ Rekurrensspirillen, Färbung 130.
*Nilblausulfat*, Fettfärbung 83.
*Nissl*, Färbung der Ganglienzellen 191.
*Nochte*, Modifikation der Färbung von Romanowsky-Ziemann 152.

## O.

*Objektivlinse* 2.
*Objektmarkierer* 4. 5.
*Objektmikrometer* 4.
*Objekttisch*, heizbarer 5.
*Objektträger* 6.
„ hohlgeschliffene 98.
*Oedem*, malignes 117.
*Oelimmersion* 1. 2. 3.
*Ohr* 180.
*Okular* 2.
*Okularmikrometer* 4.
*Oppel*, Darstellung des Faserwerks der Leber 168.
*Orceinfärbung* des Aktinomyces 129.
„ elastischen Fasern 70.
*Origanumöl* 48.
*Orseillefärbung* des Aktinomyces 129.
*Orth*, Härtungsflüssigkeit 17.
*Osmiumsäure* als Härtungsflüssigkeit 18.
„ als Isolationsflüssigkeit 10.
„ als Zusatzflüssigkeit 12.
„ als Zusatz zu Entkalkungsflüssigkeiten 24.
„ als Fettreagens 81.

## P.

*Pacini*'sche Flüssigkeit 181.
*Pal*, Färbung markhaltiger Nervenfasern 200.
*Pankreas*, Untersuchung 168.
*Pankreasextrakt* 44.
*Pappenheim*, Blutuntersuchung 146. 150. 151.
„ Smegmabazillen 126.
*Paraffincelloidineinbettung* 33.
*Paraffineinbettung* 30.
*Paraffinpräparate*, Aufkleben auf den Objektträger 39.
„ Serienschnitte 43.
*Parasiten*, tierische 136.
*Pasini*, Epithelfaserfärbung 164.
*Pestbacillus* 119.
*Pfeiffer*, Fuchsinfärbung von Bakterienschnittpräparaten 112.

*Phlorogluzinmethode* zur Entkalkung 22.
*Pick-Jacobsohn*, Bakterienfärbung 101.
*Pigmentatrophie* 93. 95.
*Pigmentbildung* 89.
*Pikrinsäure*, Doppelfärbung 60.
„ Entkalkung 24.
„ Härtung 18.
*Pikrokarmin* 55.
*Pikrolithionkarmin* 55.
*Pinselverfahren* für Schnitte 44.
*Placentarrest*, Untersuchung 173.
*Planspiegel* 4.
*Plasmazellen* 157.
*Plasmodien* 139.
*Pneumoniecoccus* 114.
*Polarisationseinrichtung* 5.
*Pommer*, Knochenfärbung 175.
*Pranter*, Orceinmethode 70.
*Präparate*, frische, Färbung 12.
„ „ Untersuchung 7.
„ „ Schnitte 8. 9.
*Präpariernadel* 7.
*Präparierstativ* 5.
*Protoplasmastrukturen* 65.
*Protozoen* 138.
*Pyocyaneus* 117.

## Q.

*Quetschpräparat* 8.
*Quincke*, Nachweis von Eisen 90.

## R.

*Rabl's* Chromameisensäure 64.
*Ramón y Cajal*, Darstellung der Nervenfasern 197.
*Rasiermesser* 8.
*Rauschbrandbacillus* 117.
*Reagentien* für Untersuchung frischer Präparate 10.
*Rekonstruktion*, plastische 43.
*Rekurrensspirillen* 130.
*Recklinghausen*, *v.*, Darstellung der Knochenkanälchen 176.
*Respirationsapparat* 171.
*Retina*, belichtete und unbelichtete 179.
*Revolverapparat* 2.
*Rhinosklerombazillen* 116.
*Romanowsky-Ziemann*, Färbung 151.
„ „ „ für Bakterien 104.
„ „ „ Bluttplättchen 159.
„ „ „ Ganglienzellen 195.
„ „ „ Malaria 140.
„ „ „ Schimmel- u. Sproßpilze 135.
*Rosin*, Methylenblau, eosinsaures 153.
*Rot* aus Methylenblau 153.
*Rotzbazillen* 118.
*Roussin*, Untersuchungsflüssigkeit für Blut 181.
*Rubinstein*, Blutfixierung 146.
*Ruprecht*, Knochenkanälchen 176.
*Russell*, Darstellung d. Zelleinschlüsse 66.

## S.

*Safraninfärbung* 57.
*Sahli*, Methylenblaulösung 136.
*Salpetersäure* zur Entkalkung 21.
*Salzsäure* als Zusatzflüssigkeit 12.
„ zur Entkalkung 23.
*Salzsäurespiritus* 46.
*Samenflecke*, Untersuchung 184.
*Sarcina* ventriculi 136.
*Scharlach* R. 82.
*Schaukelmikrotom* 37.
*Scheffer*, Knochenfärbung 175.
*Scheibenblendung* 3.
*Schellacklösung* zum Aufkleben von Paraffinschnitten 39.
*Scherenschnitte* 8.
*Schilddrüse* 171.
*Schimmelpilze* 134.
*Schleimbeutel* 178.
*Schleimhäute* 165.
*Schleimfärbung* 76.
*Schlittenmikrotom* 36.
*Schmaus*, Urankarminfärbung 191.
*Schmorl*, Knochenfärbung 177.
*Schnellbeize* von Weigert 198.
*Schnelleinbettung* 30. 32.
*Schnitte*, Anfertigung 38.
„ Aufbewahrung in Glyzerin 47.
„ „ „ Kali aceticum 48.
„ „ „ Kanadabalsam 48.
„ Auspinselung 44.
„ Ausschüttelung 44.
„ Entwässerung 48.
„ Färbung 45.
„ von Gelatinekulturen 113.
„ in Serien 40ff.
„ Verdauung, künstliche 44.
*Schnittstrecker* 38.
*Schridde*, Gleichzeitige Fixierung und Druckfärbung 62.
„ Modifikation der Altmannschen Methode 65.
*Schusterkugel* 3.
*Schüttelmethode* für Schnitte 44.
*Schütz*, Gonokokkenfärbung 115.
*Schwefelammoniumreaktion* auf Eisen 90.
*Schwefelkohlenstoff* zur Paraffineinbettung 32.
*Schweinerotlauf*, Bacillus 118.
*Schwellung*, trübe 95.
*Sedimentierungsverfahren* zum Nachweis der Tuberkelbazillen 123.
*Sehnen*, Untersuchung 178.
*Sehorgan* 178.
*Seifen*, Darstellung 84.
*Seifen* zur Einbettung 33.

*Serienschnitte* 40.
*Serum*, künstliches 9.
*Sharpey*'sche Fasern 175.
*Siebdosen* von Steinacher 6.
*Silbermethode* für Ganglienzellen 196.
„ zur Darstellung der Zellgrenzen 67.
*Smegmabazillen* 126.
*Soor* 136.
*Spatel* 7.
*Spermatozoen*, Färbung 185.
*Spiralen*, Curschmann'sche 173.
*Spirillen* 130.
*Spirochaete pallida* 131.
*Spirochaeten* 130.
*Sporen*, Färbung 106.
*Sprosspilze* 134.
*Sputum* 171.
„ Sedimentierungsverfahren 123.
*Stabilit* zum Aufkleben von Celloidinpräparaten 30.
*Staphylococcus* pyogenes 114.
*Stärkekörner*, Nachweis 78.
*Steinach's* Siebdosen 6.
*Stieda*, Nachweis von Eisen 90.
*Strasser's* Methode für Serienschnitte 43.
*Streptococcus* erysipelatis 114.
„ pyogenes 114.
*Stroschein*, Sedimentierungsverfahren 123.
*Stückfärbung* 61.
*Studentenmikrotom* 35.
*Sublimat* zur Darstellung der Mitosen 63.
„ zur Härtung 17.
*Sudan* zum Nachweis des Fettes 82.
*Syphilisspirochaeten* 131.

## T.

*Tandler*, Injektionsmasse 26.
„ Methode der Serienschnitte 42.
*Tänzer*, Fasern, elastische 70.
*Teichmann*'sche Kristalle 182.
*Tereben* 112.
*Terpentinöl* 48.
*Tetanusbacillus* 117.
*Tetragenus* 115.
*Tetrandermikrotom* 37.
*Thiersch's* Injektionsmasse 27.
*Thionin*, Amyloidnachweis 79.
„ Lösung von Nicolle 101.
„ Nervenzellfärbung 195.
„ zur Färbung des Muzins 76.
„ zur Knochenfärbung 177.
*Thoma's* Entkalkungsmethode 22.
*Thoma-Zeiss*, Zählapparat 161.
*Toison's* Verdünnungsflüssigkeit 160.
*Toluidinblaufärbung* des Amyloids 79.
*Toluol* 31.
*Trautenroth*, Smegmabazillen 126.
*Triacidgemische* 150.
*Trichine* 137.
*Trichloressigsäure* 24.
*Tripelphosphat* 170.
*Trockenmethode*, Unna's für Schnitte 113.
*Tropaeolin*, Entfärbung durch 102. 125.
*Trypsinlösung* zur künstl. Verdauung 45.
*Tuberkelbazillen* 122.
„ im Harn 169.
„ im Sputum 123. 171.
*Turnbulls* Blau 92.
*Typhusbazillen* 120.
*Tyrosin* 170.

## U.

*Ulcus* molle 120.
*Unger*, Färbung der Spermatozoen 185.
„ Melaninfärbung 93.
*Unna*, Bakterien der Haut 136.
„ Darstellung der elastischen Fasern 70.
„ Darstellung des Keratohyalins 73.
„ Darstellung des kollagenen Gewebes 68.
„ Darstellung der Plasmazellen 157.
„ Färbung des Bacillus des Ulcus molle 120.
„ Trockenmethode für Schnittpräparate 113.
*Untersuchung*, frische, von Geweben 7.
*Urankarmin* 191.
*Uterusschleimhaut*, Untersuchung 173.

## V.

*Verdauung*, künstliche 44.
*Verhornung* 72.
*Verkalkung* 88.
*Vesuvin* siehe Bismarckbraun.
*Vierfachfärbung* nach E. Fraenkel 70.
*Vitale* Färbung 12.

## W.

*Wachsumrandung* 47.
*Waldeyer's* Chromsäuremethode zur Entkalkung 23.
„ Chlorpalladiumlösung z. Entkalkung 23.
*Wederhake*, Spermatozoenfärbung 185.
*Weigert's* Aktinomycesfärbung 128.
„ Bakterienfärbung 110.
„ Eisenhämotoxylin 53.
„ Fasern, elastische Färbung 71.
„ Fibrinfärbung 74.
„ Gliafärbung 203.
Hämatoxylin z. Markscheidenfärbung 198. 199.
„ Modifikation der van Gieson-Methode 61.
„ Markscheidenfärbung der Nervenfasern 197.
„ Methode d. Serienschnitte 40.
„ Pikrokarmin 55.
*Widal*'sche Reaktion 99.
*Wiesel*, Chromaffines Gewebe 170.
*Wolters*, Achsenzylinderfärbung 201.
*Wuchernde* Gewebe, Untersuchung 96.

## X. Z

*Xylol* 31.
*Xylolkarbol*, zur Aufhellung 41. 49.
*Zählapparat* für Blutkörperchen 161.
*Zalewski*, Eisennachweis 91.
*Zedernholzöl* 2. 32.
*Zeichenapparat* 4.
*Zeichenokular* 4.
*Zelleinschlüsse*, Darstellung nach Altmann 65.
„ Darstellung n. Russel 66.
*Zellen*, eosinophile 148.
„ im Sputum 173.
*Zellgrenzen* 67.
*Zenker*'sche Härtungsflüssigkeit 18.
*Zentralnervensystem* 178.
*Zentrifugierungsverfahren* 8.
*Zettnow*, Geißelmethode 106.
*Ziehl-Neelsen*, Tuberkelbazillenfärbung 124.
*Zieler*, Polychrome Methylenblaufärbung 113.
*Zuckerplattenmethode* f. Serienschnitte 42.
*Zupfpräparat* 8.
*Zusatzflüssigkeiten* 9.
*Zylinderblendung* 3.
*Zylindermikrotome* 36.

Julius Hager Leipzig.